

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS  
CÂMPUS CAMPO MOURÃO – PARANÁ

ANDERSON CLAYTON DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E IMPORTÂNCIA DA  
PESQUISA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA EM  
COUVES MINIMAMENTE PROCESSADAS, COMERCIALIZADAS  
NO MUNICÍPIO DE CAMPO MOURÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2013

ANDERSON CLAYTON DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E IMPORTÂNCIA DA  
PESQUISA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA EM  
COUVES MINIMAMENTE PROCESSADAS, COMERCIALIZADAS  
NO MUNICÍPIO DE CAMPO MOURÃO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito para a obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.

CAMPO MOURÃO

2013

## TERMO DE APROVAÇÃO

### Caracterização Microbiológica e Importância da Pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva em Couves Minimamente Processadas, Comercializadas no Município de Campo Mourão

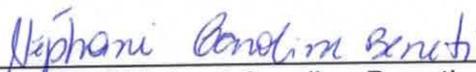
**Anderson Clayton da Silva**

Este trabalho foi apresentado às 16:00 do dia 24 de setembro de 2013 como requisito para obtenção do título de graduação do curso superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi avaliado pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.



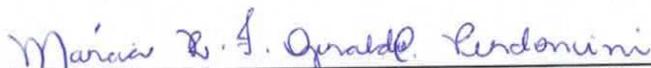
---

**Membro 1** – Lívia Bracht  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)  
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos



---

**Membro 2** – Stéphanie Caroline Beneti  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)  
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos



---

**Orientadora** – Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM)  
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos

## Resumo

Vegetais minimamente processados passam por algumas etapas durante seu preparo do qual acontecem modificações na sua forma natural, mas sempre mantendo a qualidade do produto fresco. Este trabalho teve como objetivo avaliar as condições microbiológicas de couve minimamente processadas em relação a coliformes a 35°C e 45°C, *Salmonella sp*, estafilococos coagulase positiva, microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e psicrotróficos. A contagem de coliformes foi realizada pelo método de plaqueamento sobre camada em VRBA, e suas confirmações para coliformes a 35°C em VBB, e coliformes a 45°C em caldo EC. Para pesquisa de *Salmonella sp* e *Staphylococcus aureus* uma parte foi realizada por métodos rápidos em petrifilme e outra pelo método convencional segundo a Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Para microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e psicrotróficos foram realizados plaqueamento em profundidade em Agar PCA. Das 9 análises realizadas somente 1 apresentou número de coliformes acima do padrão, sendo esta mesma evidenciando  $5,4 \times 10^6$  UFC/g (est.) de coliformes a 35°C. Todas tiveram ausência se *Salmonella sp*, e 7 das 9 análises para *Staphylococcus aureus* apresentaram elevada contagem. A contagem de mesófilos e psicrotróficos em comparação a estudos similares encontram-se com resultados parecidos, mas dos quais os autores dizem haver uma alta contagem. Por fim, foi possível concluir que das 9 análises realizadas somente 2 estavam próprias para consumo humano, segundo a Resolução - RDC Nº 12 de Janeiro de 2001.

**Palavras- chave:** couve minimamente processada, perfil microbiológico de hortaliças; *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

Minimally processed vegetables go through some stages during their preparation which changes occur in their natural form, but always maintaining the quality of fresh produce. This study aimed to evaluate the microbiological conditions of minimally processed cabbage against coliforms at 35 ° C and 45 ° C, *Salmonella* sp, coagulase positive, mesophilic strict and facultative aerobic and psychrotrophic viable. The coliform count was performed by plating layer on VRBA, and their confirmations for coliforms at 35 ° C in VBB, and coliforms at 45 ° C in EC broth. To search *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* part was performed by rapid methods in petrifilme and other conventional method according to Normative Instruction N<sup>o</sup>. 62 of August 26, 2003. For mesophilic strict and facultative aerobic and psychrotrophic viable plating were performed in depth Agar PCA. From 9 analyzes showed only 1 number of coliforms above the standard, and this same showing x10<sup>6</sup>UFC 5.4 / g (est.) of coliforms at 35 ° C. All had absence of *Salmonella* sp, and 7 of 9 tests for *Staphylococcus aureus* showed high counts. The count of mesophilic and psychrotrophic compared to similar studies are with similar results, but of which the authors say there is a high count. Finally, it was concluded that the 9 analyzes only two were fit for human consumption, according to Resolution - RDC N<sup>o</sup> January 12, 2001.

**Keywords:** minimally processed cabbage; microbiological profile of vegetables; *Staphylococcus aureus*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Etapas do processamento mínimo de frutas e hortaliças.....	14
FIGURA 2: Prova presuntiva de coliformes em Agar VRBA.....	31
FIGURA 3: Prova confirmativa de Coliformes a 45°C.....	31
FIGURA 4: Prova presuntiva de coliformes.....	33
FIGURA 5: Prova confirmativa de coliformes a 35°C.....	34
FIGURA 6: Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> em Petrifilme.....	35
FIGURA 7: Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> ágar BPSL.....	35
FIGURA 8: Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> ágar XLD.....	35
FIGURA 9: Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> em Petrifilm.....	37
FIGURA 10: Pesquisa de mesófilos aeróbios estritos facultativos viáveis.....	39
FIGURA 11: Pesquisa de microrganismos psicrotróficos.....	41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Microrganismos a serem pesquisados segundo RDC N° 12.....	18
TABELA 2. Resultados da análise de Coliformes a 45°C.....	30
TABELA 3. Resultados da análise de Coliformes a 35°C.....	32
TABELA 4. Resultados da análise de estafilococos coagulase positiva.....	37
TABELA 5. Resultados da análise mesófilos aeróbios estritos e facultativos...	39
TABELA 6. Resultados da análise de Psicotróficos.....	40

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVO .....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivo específico.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 Vegetais minimamente processados .....	13
3.2 Couve minimamente processadas .....	16
3.3 Contaminação microbiológica em vegetais minimamente processados 16	
3.4 Microrganismos a serem pesquisados em amostras de couve minimamente processados .....	17
3.5 Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C .....	18
3.5.1 Coliformes Totais (35°C) .....	18
3.5.2 Crescimento.....	18
3.5.3 Coliformes Fecais e <i>Escherichia Coli</i> .....	19
3.6 <i>Salmonella sp</i> .....	20
3.6.1 Características do microrganismo.....	20
3.6.2 Distribuição .....	20
3.6.3 Infecção Alimentar por <i>Salmonella</i> .....	20
3.7 Estafilococos Coagulase Positiva.....	21
3.7.1 Espécies de interesse em alimentos .....	21
3.7.2 Habitat e distribuição.....	21
3.7.3 Gastrenterite Estafilocócica .....	22
3.8 Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis e Microrganismos Psicrotróficos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
4.1 Materiais .....	24
4.1.1 Matéria-prima .....	24
4.1.2 Reagentes e materiais .....	24
4.1.3 Equipamentos.....	24
4.2 Métodos .....	24
4.2.1 Coleta das amostras .....	24
4.2.2 Análises microbiológicas .....	25
4.2.3 Preparo das Amostras e Diluições Seriadas.....	25
4.2.4 Análise de Coliformes Totais (35°C) e Termotolerantes (45°C) ....	26
4.2.5 Análise de <i>Salmonella sp</i> /25g .....	27
4.2.6 Análises de Estafilococos Coagulase Positiva .....	28

4.2.7	Análise de Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis .....	29
4.2.8	Análise de Microrganismos Psicotróficos .....	29
4.2.9	Análise Estatística .....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	30
5.1	Pesquisa de Coliformes a 45°C .....	30
5.2	Pesquisa de Coliformes a 35°C .....	32
5.3	Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> /25g .....	34
5.4	Pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva .....	36
5.5	Pesquisa de Microrganismo Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis .....	38
5.6	Pesquisa de Microrganismo Psicotróficos .....	40
6.	Conclusão .....	43
7.	Referências.....	44

## 1. INTRODUÇÃO

Os vegetais, como bem diz sua definição botânica, são seres carentes da capacidade de transladar-se de um lugar a outro; em que os órgãos de nutrição, respiração etc., estão na parte externa do corpo; nos quais predominam, em sua composição, substâncias glicídicas que, para sua alimentação, utilizam matérias orgânicas do solo e da atmosfera (EVAGELISTA, 2001).

Apesar de apresentarem camada externa de proteção que apresentam e que quando íntegra, age como uma barreira contra a penetração de germes, os vegetais podem ser alterados por todos aqueles agentes capazes de danificar principalmente suas características sensoriais; entre esses agentes, podem ser citados os que atuam por meio físico (agressões traumáticas, queimaduras durante a congelação), por ação enzimática, por depredação (insetos e roedores), por causas mecânicas, (manobras de manipulação e transporte) e microrgânicas (EVAGELISTA, 2001).

As perdas relativas à deterioração de vegetais provocadas pelas chamadas “doenças de mercado” correspondem a aproximadamente 20% de toda a colheita. Só no Brasil, em 1991, as perdas atingiram 10 milhões de toneladas, equivalentes a 5 bilhões de dólares (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As causas dessas perdas podem ter origem microbiológica ou serem devidas à manipulação e acondicionamento inadequados, sazonalidade e rede de armazenamento insuficiente (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A flora microbiana de vegetais retirados da terra deve ser a mesma do solo onde esses vegetais cresceram, embora ocorram exceções. Os actinomicetos (uma divisão das bactérias Gram positivas) são as bactérias mais abundantes em solos estáveis, embora raramente sejam encontrados em produtos vegetais. Por outro lado, as bactérias acidolácticas não são facilmente encontradas no solo, mas são uma parcela significativa da biota bacteriana de plantas e seus produtos. A grande exposição desses produtos ao ambiente proporciona uma contaminação por microrganismos. A camada protetora de muitas frutas e vegetais e o pH que alguns possuem, com valores abaixo do pH de crescimento de muitos microrganismos, são fatores importantes na

microbiologia desses produtos (JAY, 2005).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as características microbiológicas de amostra de couve minimamente processadas comercializada no município de Campo Mourão/PR.

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* presente neste trabalho foi feita com intuito de ressaltar sua importância em minimamente processados, pois esse microrganismo não é obrigatoriamente pesquisado para este tipo de alimento segundo a Resolução - RDC Nº 12 de Janeiro de 2001, mas é de grande importância em alimentos minimamente processado, devido sua manipulação.

Algumas pesquisas adicionais foram estabelecidas ao fim do trabalho como a contagem de Coliformes Totais esta foi realizada com intenção de descobrir a contaminação total do alimento, devido à alta contagem de Estafilococos Coagulase Positiva e alta contagem de colônias na prova presuntiva de Coliformes em VRBA (Ágar cristal violeta vermelho neutro bile). Sendo a outra pesquisa a contagem de microrganismos psicotróficos, pois se tratando de um alimento refrigerado, destaca-se a importância da pesquisa para tal microrganismo.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliaram-se as características microbiológicas de amostra de couve minimamente processadas comercializada no município de Campo Mourão/PR.

### **2.2 Objetivo específico**

- Determinou-se a análise de Coliformes Totais (35°C) e Coliformes Termotolerantes (45°C) em amostras de couve minimamente processada.
- Determinou-se a análise de *Salmonella sp* em couve minimamente processada.
- Determinou-se a análise de Estafilococos Coagulase Positiva em amostra de couve minimamente processada.
- Determinou-se a análise de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis em couve minimamente processada.
- Determinou-se a análise de Microrganismos Psicrotróficos.

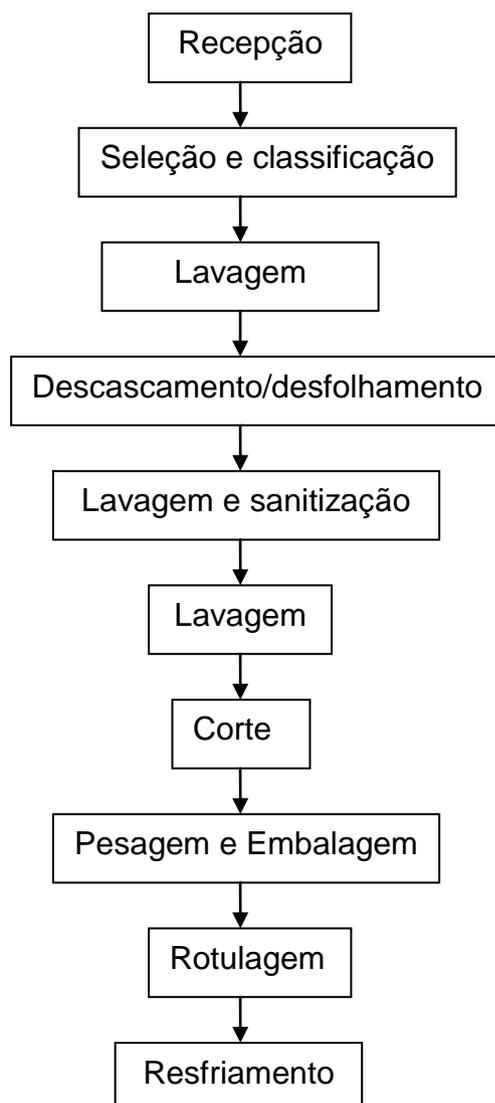
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Vegetais minimamente processados

Decididamente as hortaliças minimamente processadas entram no mercado para ficar, e são várias as razões para que isto aconteça. A falta de tempo para preparar as refeições, a busca de alimentos mais elaborados e sofisticados denominados de produtos de “conveniência”, o aumento do consumo de hortaliças em todas as suas formas como meio de obter mais saúde e melhor qualidade de vida, fazem com que este segmento do mercado esteja obtendo uma evolução muito rápida em todo o território nacional, principalmente nas grandes concentrações urbanas (NASCIMENTO; MOLICA; MORAES, 2000).

A produção de frutas pré-cortadas e embaladas e de saladas de vegetais minimamente processadas causou uma explosão nas vendas e no consumo desses produtos na última década, apresentando ainda sinais de crescimento. Basicamente, as saladas são compostas de vegetais, como alface e cenoura, e frutas, como melões e melancias, cortados, higienizados, embalados em recipiente incolor e armazenados sob temperaturas de refrigeração, tornando-se prontos para consumo (PPC). Quando embalados em filmes de alta permeabilidade ao oxigênio, os cuidados principais são com a qualidade do produto e com o escurecimento enzimático no caso de produtos com cores claras. Contudo, quando embalagens de baixa permeabilidade ao oxigênio são utilizadas, juntamente com longos prazos de estocagem, existe a possibilidade de crescimento de microrganismos patogênicos como o *C. botulinum* e a *L. monocytogenes*. Este fato tem acarretado numerosos estudos sobre a segurança final dos produtos PPC (JAY, 2005).

A Figura 1 exibe o fluxo grama do processamento de hortaliças segundo (NASCIMENTO; MOLICA; MORAES, 2000).



**Figura 1** – Etapas do processamento mínimo de frutas e hortaliças.

Segundo Nascimento, Molica e Moraes (2000):

**Recepção:** As hortaliças deverão ser lavadas para a agroindústria o mais cedo possível após a aquisição, para evitar qualquer tipo de alteração química ou física, e deve ser colocada em local fresco e ventilado ao abrigo do sol. As hortaliças verdes e /ou imaturas (alface, pepino, salsa, abobrinha etc.) que têm altas taxas de respiração não devem ser estocadas devendo ser processadas de imediato.

**Seleção/Classificação:** A recepção ocorre na área “suja” da agroindústria, e é nela que os produtos são selecionados, retirando-se do lote os que tenham manchas de doenças. Também são separados os produtos com tamanhos diferentes e os que estejam em estádios diferentes de maturação.

**Lavagem:** As hortaliças devem ser lavadas em água corrente de boa qualidade, fazendo sua imersão. O objetivo da lavagem é eliminar sujidades que a grande parte das hortaliças possui pelo contato com o solo, poeira etc. Aquelas que apresentam cascas duras e grossas, como as abóboras secas, devem ser lavadas e esfregadas com uma escova e detergente neutro para a retirada total das sujidades.

**Descascamento/Desfolhamento:** O descascamento consiste na retirada de cascas (cenoura e chuchu) e dependendo da hortaliça, tal processo pode ser feito manualmente ou com uma máquina apropriada. Já o desfolhamento consiste em se separar as folhas do caule não comestíveis (brócolis).

**Lavagem/Sanitização:** As hortaliças descascadas ou desfolhadas devem ser lavadas em água corrente de boa qualidade; a seguir, passadas por duas águas de lavagem. A primeira lavagem feita com 50mg/l de CRT (cloro residual total), preparada a partir do hipoclorito de sódio comercial, contendo 12% de CRT, por vinte minutos e a segunda, com água corrente. A quantidade de cloro e o tempo de imersão irá variar de acordo com a sujidade das hortaliças e a qualidade da água.

**Corte:** O corte irá variar com o mercado consumidor podendo utilizar um processador de alimentos ou ser manual. Os cortes poderão ser:

Tipo cubo – poderá ser manual ou por máquina, e o tamanho pode variar conforme a demanda de mercado e o destino final do produto (cenoura, abóbora, chuchu).

Tipo tolete – cortar os pedaços variando de 6 a 10 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro (mandioca).

Tipo ralada – cortada em tiras finas obrigatoriamente com equipamento próprio (cenoura, beterraba, repolho).

**Centrifugação:** As hortaliças serão colocadas em sacos apropriados e depois na centrífuga irá variar de hortaliça para hortaliça e é definido pelo momento em que não saia mais água na centrífuga.

**Pesagem/Embalagem:** Os produtos serão colocados em sacos de polietileno ou em bandejas de isopor sendo vedado com filmes de PVC e pesados em balança eletrônica. Após a secagem, serão selados com seladora de pedal para os sacos e seladora de mesa para bandejas. Os sacos de

polietileno poderão ser vedados em seladoras a vácuo. Neste caso não se recomenda embalar á vácuo as hortaliças folhosas, portanto aconselha-se a embalar desta forma as hortaliças mais consistentes (abóbora, chuchu, mandioca, salsão, cenoura).

**Rotulagem:** A rotulagem é o processo de identificação do produto e do produtor. Através dele o produto será reconhecido pelo consumidor, que também se identificará com o produtor. Deve ser criativo, atrativo, e seu desenho e nome devem estar preferencialmente ligados ao produto. Deve conter também todas as informações exigidas pela legislação, bem como não trazer informações que possam induzir o consumidor a erros (NASCIMENTO; MOLICA; MORAES, 2000).

### **3.2 Couve minimamente processadas**

A couve (*Brassica oleracea var. acephala*) de folha ou couve comum é muito rica em nutrientes, especialmente cálcio, ferro, vitaminas A, C, K e B5. É escassa em calorias, mas satisfaz muito bem a sensação de apetite. É uma hortaliça originada da costa do Mediterrâneo e pertencem à família das Brássicas, assim como o repolho, o brócolis, a couve-flor e o rabanete (LANA et al., 2013).

A couve é uma hortaliça com rápida perda de turgescência e senescência pós-colheita. Pode ser encontrada comercialmente, na forma de minimamente processada, porém com curto prazo de validade (PUSCHMANN et al., 2013).

### **3.3 Contaminação microbiológica em vegetais minimamente processados**

Os vegetais, especialmente as frutas e hortaliças, podem ser contaminados em seus diversos estados: frescos e industrializados (EVAGELISTA, 2001).

A sua contaminação microbiana pode ocorrer antes e depois de sua colheita, através do solo, do ar, da rega ou lavagem com águas impróprias, das más condições higiênicas de envoltórios e recipientes, por transportes

inadequados e agressões mecânicas contra a estrutura do produto (EVAGELISTA, 2001).

Em geral, os produtos PPC não podem ser considerados livres de microrganismos. Durante o seu preparo, os vegetais inteiros são lavados, normalmente com água contendo cloro entre 50 e 200 ppm, e depois cortados e embalados. Enquanto a lavagem reduz o número de microrganismos, a operação de corte tem o potencial de recontaminar o produto. Além disso, os vegetais recém-cortados apresentam um índice de umidade mais elevado, maior quantidade de nutrientes simples e maior superfície de contato que os vegetais não-cortados, fazendo com que os produtos PPC se tornem mais susceptíveis ao crescimento de microrganismos (JAY, 2005).

### **3.4 Microrganismos a serem pesquisados em amostras de couve minimamente processados**

Os microrganismos que devem ser pesquisados segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis) está apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Microrganismos a serem pesquisados segundo RDC Nº 12.

Grupo de alimentos	Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa	Tolerância para amostra representativa			
			n	c	m	M
b) frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto, com exceção de cogumelos.	Coliformes a 45°C/g	10 <sup>2</sup>	5	2	10	10 <sup>2</sup>
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável. M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis. n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. c: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes).

### 3.5 Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C

#### 3.5.1 Coliformes Totais (35°C)

Os coliformes são bastonetes Gram-negativos, não esporulados, que fermentam a lactose dentro de 48 horas e produzem colônias escuras com brilho metálico em ágar tipo Endo. De forma geral os coliformes são representados por quatro gêneros da família Enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*. Algumas linhagens de *Arizona hinshawit* e *Hafnia alvei* fermentam a lactose, porém, geralmente, não dentro de 48 horas, e algumas linhagens de *Pantoea agglomerans* são lactose-positivas em 48 horas (JAY, 2005).

#### 3.5.2 Crescimento

Os coliformes são capazes de crescer na presença de sais biliares, os quais inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas. Isso confere uma vantagem no seu isolamento seletivo a partir de várias fontes. Ao contrário de muitas outras bactérias, os coliformes tem a capacidade de fermentar a lactose

com produção de gás, sendo esta única característica suficiente para determinações presuntivas. Em geral, a facilidade com que os coliformes podem ser cultivados e diferenciados torna-os praticamente indicadores ideais, exceto pela dificuldade de identificação de linhagens atípicas. Os fermentadores aberrantes de lactose, no entanto, parecem ter importância sanitária questionável (JAY, 2005).

### 3.5.3 Coliformes Fecais e *Escherichia Coli*

A presença em alimentos, deste microrganismo (sem *Escherichia coli*), indica a sua contaminação, veiculada por poeiras, águas poluídas, manuseio e outros fatores poluentes, durante e posteriormente ao processamento do produto (EVAGELISTA, 2001).

Em alimentos vegetais frescos, o único indicador válido de contaminação fecal é a *E. coli*, uma vez que os demais indicadores de contaminação fecal são encontrados naturalmente nesse tipo de alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O aparecimento de coliformes denuncia a contaminação não fecal e sim por microrganismos patogênicos (salmonelas, shigelas etc.) e de outras floras presentes quando se apresentam condições de pouca higiene (EVAGELISTA, 2001).

A contaminação fecal é indicada quando outros coliformes se juntam à *Escherichia coli* (EVAGELISTA, 2001).

Segundo Franco e Landgraf (2008), em alimentos processados, a presença de um número considerado de coliformes ou de *Enterobacteriaceae* indica:

- Processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, sendo as causas mais frequentes aquelas provenientes de matéria prima, equipamentos sujos ou manipulação sem cuidado de higiene;
- Proliferação microbiana que poderia permitir a multiplicação de microrganismos patogênicos e toxigênicos.

## **3.6 *Salmonella* sp**

### **3.6.1 Características do microrganismo**

As salmonelas possuem cerca de 1.200 sorotipos e se apresentam em forma de pequenos e curtos bastões, móveis na maioria das vezes, por flagelos peritricos; são aeróbicas e mesófilas (EVAGELISTA, 2001).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos gram-negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir de glicose (exceto *S. typhi*) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, e exceção à *S. pullorum* e à *S. gallinarum*, que são imóveis (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### **3.6.2 Distribuição**

O habitat primário da *Salmonella* é o trato intestinal de animais, como pássaros, répteis, animais de granja, homem e ocasionalmente insetos. Embora seu habitat primário seja o trato intestinal, a *Salmonella* pode ser encontrada, de tempos em tempos, em outras partes do corpo. Como forma intestinal, os quais podem ser transmitidos por insetos e por outros organismos vivos para um grande número de localidades. Dessa forma, a *Salmonella* pode também ser encontrada na água, especialmente em águas poluídas. Quando água poluída e alimentos que foram contaminados são consumidos por pessoas e outros animais, esses microrganismos são novamente excretados no material fecal, continuando o ciclo. O aumento deste ciclo por meio da navegação internacional de animais e de alimentos é, em grande parte, responsável pela distribuição mundial de *Salmonella* e seus consequentes problemas (JAY, 2005).

### **3.6.3 Infecção Alimentar por *Salmonella***

A síndrome é causada pela ingestão de alimentos que contenham números significativos de espécies ou sorovares não hospedeiro específico do

gênero *Salmonella*. Os sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão dos alimentos, embora períodos mais curtos e longos já tenham sido relatados. Os sintomas consistem em náuseas, vômitos, dores abdominais (não tão agudas como na intoxicação estafilocócica), dor de cabeça, calafrios diarreia. Esses sintomas são geralmente acompanhados por fraquezas, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência, os quais persistem por 2 a 3 dias. A taxa de mortalidade, em média, é de 4,1%, sendo de 5,8% durante o primeiro ano de vida, 2% entre o primeiro e os 50 anos e de 15% em pessoas acima de 50 anos. Entre as diferentes espécies de *Salmonella*, a *S. Choleraesuis* foi descrita como a que apresenta maior taxa de mortalidade, 21% (JAY, 2005).

### **3.7 Estafilococos Coagulase Positiva**

#### **3.7.1 Espécies de interesse em alimentos**

O gênero *Staphylococcus* inclui mais de 30 espécies, e aquelas de real interesse em alimentos estão listadas em 18 espécies e subespécies, somente seis são coagulase-positivas e geralmente produzem nuclease termoestável (TNase). Das espécies coagulase-negativas, 10 demonstram a capacidade de produzir enterotoxinas, mas não produzem nucleases, ou, se produzem, elas não são termossensíveis. As linhagens enterotoxigênicas coagulase-negativas não são estáveis na produção de hemolisinas ou na fermentação do manitol. A amplamente utilizada prática pesquisa de estafilococos coagulase-positivos em alimentos, levou a estimativas inferiores da real prevalência de linhagens produtoras de enterotoxinas (JAY, 2005).

#### **3.7.2 Habitat e distribuição**

Orelhas, o nariz e a boca: Estas áreas do corpo podem abrigar *S. aureus* (Bactérias encontradas em 40 a 45% dos adultos). Este microrganismo contribui em grande parte com as intoxicações alimentares, e são disseminados quando se espirra, tosse, assobia ou ao se assoar o nariz. Portanto os manipuladores não devem provar alimentos com os dedos, e, ao assoar o nariz, devem usar lenços descartáveis e lavar as mãos após o ato. A

máscara de rosto é um equipamento de uso obrigatório no interior da área de processamento (NASCIMENTO; MOLICA; MORAES, 2000). Evitando contaminação de alimentos a serem processados.

A permanência de *Staphylococcus* em alimentos constitui uma soma de falhas higiênicas e do ajustamento de fatores ambientais, como, por exemplo, a temperatura mal controlada (EVAGELISTA, 2001).

As espécies de *Staphylococcus* são hospedeiro-adaptadas, e metade das espécies conhecidas habitam somente humanos (p. ex., *S. cohnii subsp. Cohnii*) ou humanos e outros animais (p. ex., *S. aureus*). Um maior número tende a ser encontrado próximo a abertura do corpo e superfícies da pele, como, por exemplo, nas narinas, axilas e na área das virilhas. Em locais úmidos, o número por cm<sup>2</sup> pode alcançar 10<sup>3</sup> a 10<sup>6</sup>, e em habitats secos, 10 a 10<sup>3</sup>. As duas fontes mais importantes de contaminação para alimentos são fossas nasais e mãos e braços de manipuladores de alimentos com furúnculos e carbúnculos (JAY, 2005).

### 3.7.3 Gastreenterite Estafilocócica

A intoxicação alimentar estafilocócica foi estudada pela primeira vez, em 1894, por J. Denys e depois, em 1914, por M. A. Barber, que reproduziu em si mesmo os efeitos e sintomas da doença por meio de consumo de leite inoculado com cultura de *Staphylococcus aureus*. A capacidade de algumas linhagens de *S. aureus* de causar a doença alimentar foi provada de forma conclusiva em 1930 por G. M. Dock e colaboradores, os quais observam que os sintomas surgiram após a ingestão de culturas filtradas de *S. aureus*. Embora alguns autores refiram-se a doenças como envenenamento alimentar, em vez de intoxicação alimentar, a designação gastreenterite deixa óbvia a necessidade de indicar se a doença é uma intoxicação ou uma infecção (JAY, 2005).

### **3.8 Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis e Microrganismos Psicrotróficos**

Populações de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, em produtos refrigerados têm sido usadas como indicadores de qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também ideia sobre seu tempo útil de conservação. Populações elevadas destes microrganismos contribuem para a redução da vida de prateleira de hortaliças minimamente processadas, podendo indicar matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (BRUNO et al., 2005).

Microrganismos psicrófilos são aqueles cuja temperatura de crescimento encontra-se na faixa de 0°C a 20°C, com ótimo entre 10°C e 15°C e microrganismos psicrotróficos são os capazes de se desenvolver entre 0°C e 7°C, com produção de colônias ou turvação do meio de cultura em sete a 10 dias. Alguns psicrotróficos, no entanto, crescem em temperatura de até 43°C, sendo, de fato, mesófilos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Matéria-prima**

Amostras de couve minimamente processada, comercializadas em bandejas de isopor, embaladas com filme plástico ou sacos de polietileno armazenada sob-refrigeração em torno de 5°C, adquiridas em três supermercados da cidade de Campo Mourão/PR.

#### **4.1.2 Reagentes e materiais**

Vidrarias e demais materiais básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

#### **4.1.3 Equipamentos**

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas nos meses de maio a agosto de 2013. Foram coletadas 3 amostras de 3 marcas diferentes, sendo 9 amostras de couve por mês, totalizando ao fim da pesquisa 27 amostras de couve minimamente processadas. Estas amostras foram transportadas em uma pequena caixa de isopor do supermercado até o laboratório da UTFPR.

#### 4.2.2 Análises microbiológicas

As amostras foram submetidas a análises microbiológicas de contagem de Coliformes a 45°C e Estafilococos Coagulase Positiva e presença *Salmonella sp*, das quais se repetiram por 3 meses, para avaliar diferentes lotes. E somente no último mês de análise foi realizado contagem de Coliformes a 35°C, Contagem Padrão em Placas de Microrganismo Mesófilo Aeróbios Estritos Facultativos Viáveis e Contagem de Microrganismo Psicotróficos. As metodologias empregadas seguiram as de Mottin (2008), Silva (2006) e Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. E utilizaram métodos rápidos para *Salmonella SP* e Estafilococos Coagulase Positiva dos quais foram realizados em Petrifilme.

#### 4.2.3 Preparo das Amostras e Diluições Seriadas

As análises foram realizadas logo após a coleta, em condições assépticas. Cada amostra a ser analisada foi constituída por um “pool” formado por três pacotes oriundos do mesmo lote e com igual peso (Mottin, 2008; Silva 2006). O conteúdo dos três pacotes foi colocado em um único frasco estéril, em seguida misturado com auxílio de colher e bastão de vidro estéril e pesadas a fim de se retirar a unidade analítica da mistura. Uma quantidade de 25g da amostra foi homogeneizada com 225 mL de solução salina peptonada 0,1% para as análises de Coliformes a 35°C, 45°C, Estafilococos Coagulase Positiva, Contagem Padrão em Placas de Microrganismo Mesófilo Aeróbios Estritos Facultativos Viáveis e contagem de Microrganismo Psicotróficos. E em solução salina peptonada 1% para a pesquisa de *Salmonella sp*. Esta foi a diluição  $10^{-1}$ . A partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ), as demais diluições foram efetuadas até a  $10^{-3}$ , em solução salina peptonada 0,1 % de acordo com as instruções contidas no Anexo II, “Diluições e soluções” segundo a Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

#### **4.2.4 Análise de Coliformes Totais (35°C) e Termotolerantes (45°C)**

A metodologia utilizada para pesquisa de contagem de coliformes totais e termotolerantes aplica-se a amostras de matérias-primas, alimentos e rações, devendo ser utilizada quando o limite máximo tolerado for igual ou superior a 100 UFC/g ou mL, segundo a Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2003).

Fundamentos segundo a Instrução Normativa Nº 62 de agosto de 2003:

Prova presuntiva: Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA) e posterior contagem das colônias suspeitas. O ágar VRBA apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos e vermelho neutro, um indicador de pH que revela a fermentação da lactose pelos microrganismos presentes. A adição de sobrecamada visa a prevenção do crescimento e do espraiamento de colônias na superfície do ágar.

Prova confirmativa para coliformes totais: A confirmação da presença de coliformes totais é feita por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo verde brilhante bile 2% lactose e posterior incubação a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . A presença de gás nos tubos de Durhan evidencia a fermentação da lactose presente no meio. O caldo verde brilhante bile 2% lactose apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante) responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos.

Prova confirmativa para coliformes termotolerantes: A confirmação da presença de coliformes termotolerantes é feita por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo EC e posterior incubação em temperatura seletiva de  $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , em banho-maria com agitação ou circulação de água. A presença de gás nos tubos de Durhan evidencia a fermentação da lactose presente no meio. O caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante impedindo a sua acidificação. A seletividade é devido a presença de sais biliares responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos.

O padrão microbiológico de hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis) para amostra indicativa é de  $10^2$  UFC/g para Coliformes Termotolerantes (45°C), segundo a resolução – RDC Nº 12, de 02

de janeiro de 2001. Por isso utiliza-se a técnica de plaqueamento em Ágar VRBA e posterior contagem das colônias suspeitas e sua repicagem em VBB (Caldo Verde brilhante bile lactose 2%) para confirmação de coliformes a 35°C e em Caldo EC para coliformes a 45°C.

Já para a contagem de Coliformes Totais não há padrão nesta mesma legislação, sendo esta análise realizada com intuito de confirmar o porquê da alta contagem de colônias na prova presuntiva em VRBA, sendo que na maioria dos lotes nunca era confirmada a presença de Coliformes a 45°C.

#### **4.2.5 Análise de *Salmonella* sp/25g**

A metodologia utilizada para pesquisa de presença de *Salmonella* sp/25g aplica-se a amostras de alimentos de origem animal, rações e ingredientes, segundo a Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2003).

Os cinco primeiros lotes da pesquisa da presença de *Salmonella* sp/25g foi realizado através de métodos rápidos por meio de petrifilme, e somente as 4 ultimas foram realizadas pelo método convencional.

Fundamentos segundo a Instrução Normativa Nº 62 de agosto de 2003:

Pré-enriquecimento: Baseia-se na incubação, a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 16 a 20 horas, de  $25 \pm 0,2$  g ou  $25 \pm 0,2$  mL da amostra, adicionada de 225 mL de solução salina peptonada 1%. Esse procedimento visa minimizar os efeitos do processamento industrial dos alimentos, capaz de promover estresse nas células de *Salmonella*, sem inativá-las biologicamente.

Enriquecimento seletivo: Baseia-se na utilização de meios que contêm substâncias de ação impediante do crescimento para a maioria dos microrganismos interferentes e na incubação em temperatura seletiva.

O enriquecimento seletivo de *Salmonella* se faz obrigatoriamente nos meios líquidos seletivos, caldo Rappaport Vassiliadis e caldo selenito-cistina.

Isolamento e seleção: Baseia-se na seleção de colônias de *Salmonella* em, pelo menos, dois meios sólidos: o BPLS (ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose) obrigatoriamente e outro ágar de maior impediência escolhido pelo laboratório.

Identificação bioquímica: Baseia-se na evidenciação das propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas.

Prova de soroaglutinação: Baseia-se na reação antígeno-anticorpo, com conseqüente aglutinação do antígeno frente ao anti-soro para *Salmonella* polivalente “O”.

#### **4.2.6 Análises de Estafilococos Coagulase Positiva**

A metodologia utilizada para pesquisa de contagem de Estafilococos Coagulase Positiva foi o procedimento para a contagem de *Staphylococcus aureus* do Capítulo V da Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2003). Aplica-se a amostras de matérias-primas e alimentos. Para os produtos destinados ao comércio no MERCOSUL, a contagem final apenas dita como *Staphylococcus* coagulase positiva, segundo a Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2003).

Fundamentos segundo a Instrução Normativa Nº 62 de agosto de 2003:

Contagem: Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras em ágar Baird-Parker, cuja composição evidencia a habilidade desse microrganismo de crescer na presença de 0,01 a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2 a 0,5 % de cloreto de lítio e 0,12 a 1,26% de glicina. O *Staphylococcus aureus* reduz anaeróbia e aerobiamente o telurito de potássio, produzindo colônias negras. O ágar Baird-Parker suplementado com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *Staphylococcus aureus*, por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia, respectivamente.

Prova da coagulase: Baseia-se na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo microrganismo.

Somente as duas primeiras análises foram realizadas conforme o método convencional descrito acima, assim passando para a utilização de métodos rápidos por meio de Petrifilme para as demais pesquisas até o fim deste trabalho.

#### **4.2.7 Análise de Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis**

A metodologia utilizada para pesquisa Contagem Padrão de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis, aplica-se a amostras de matérias-primas, água e alimentos. Baseia-se na semeadura em profundidade da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem seguida de incubação em temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas, segundo a Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2003).

Esta pesquisa foi somente utilizada para ultima análise da cada marca do ultimo mês, com o objetivo de determinar a contaminação total do lote, já que nos meses anteriores as contagens de Estafilococos Coagulase Positiva em sua maioria apresentaram valores acima do padrão e a prova presuntiva de Coliformes continha um grande número de colônias.

#### **4.2.8 Análise de Microrganismos Psicotróficos**

A metodologia utilizada para pesquisa Contagem Padrão de Microrganismos Psicotróficos é aplicada a amostras de matérias-primas, água e alimentos, baseia-se na semeadura em profundidade da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem seguida de incubação em temperatura de  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10 dias, segundo Silva (2006).

#### **4.2.9 Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos á Análise de Variância (ANOVA) sobre o experimento inteiramente casualizado (DIC) e suas médias comparadas através do Teste de Tukey á nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), todos os dados matemáticos foram estatisticamente calculados através do programa ASSISTAT 7.7 Beta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Pesquisa de Coliformes a 45°C

A Tabela 2 mostra os resultados das pesquisas de coliformes a 45°C em 3 meses diferentes.

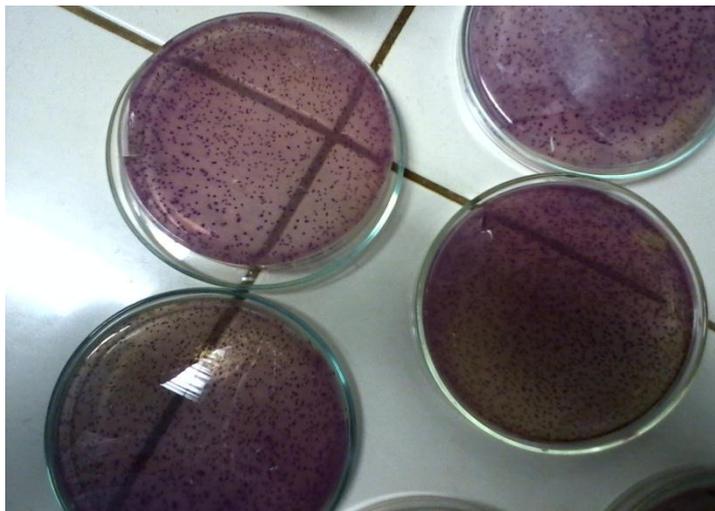
**Tabela 2** – Resultados da análise de Coliformes a 45°C:

Marca	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Média
A	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g	8,8x10 <sup>5</sup> UFC/g (est.)	2,9x10 <sup>5</sup> UFC/g±5,0x10 <sup>5a</sup>
B	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g±0 <sup>b</sup>
C	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g±0 <sup>b</sup>

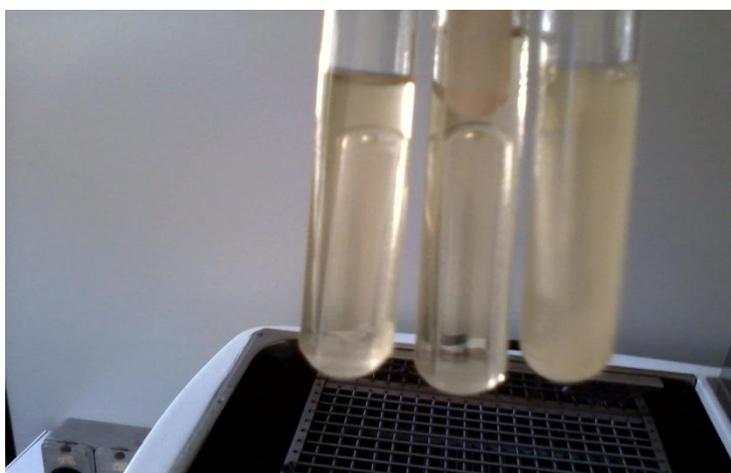
Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Est.=Estimada.

Das 9 análises realizadas, somente, em uma amostra da marca A analisada no último mês foi detectada a presença de coliformes termotolerantes acima do padrão permitido pela legislação, sendo que o padrão para este microrganismo é de 10<sup>2</sup>UFC/g segundo a resolução – RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Sendo assim encontrando-se fora do padrão estabelecidos para hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis).

As respectivas Figuras 2 e 3 apresentam a prova presuntiva de coliformes em VRBA e a prova confirmativa de coliformes a 45°C em caldo EC. A Figura 2 ilustra um grande numero de colônias típicas (rosas) e atípicas (transparentes). E na Figura 3 nos trás os tubos de Caldo EC com formação de gás no tubo de Durham que evidencia a confirmação de coliformes a 45°C.



**Figura 2** – Prova presuntiva de coliformes em Agar VRBA.



**Figura 3** – Prova confirmativa de Coliformes a 45°C.

De acordo com o trabalho de Silva (2006) com alface minimamente processadas, 10 do total das 24 amostras analisadas foram positivas para coliformes fecais. Apenas os meses de novembro de 2004 e julho de 2005 apresentaram valores  $<2,9 \times 10^1$  NMP/g. Os valores médios de coliformes fecais variam de  $<2,9 \times 10^1$  NMP/g a  $3,9 \times 10^3$  NMP/g. Índices acima do permitido ( $10^2$  UFC/g) foram observados em quatro amostras, três destas foram nos meses de janeiro e uma foi no mês de março de 2005.

Miguel (2008) pesquisou coliformes a 45°C em 9 amostra de couve minimamente processadas, onde somente uma estava dentro do padrão. As demais amostras apresentaram valores entre 93 NMP/g e 2400 NMP/g.

Segundo Silva (2006) alguns fatores podem justificar esses índices, como o maior uso de água de irrigação contaminada. Outro problema é a deficiência da manipulação do colaborador envolvido no processo de beneficiamento da couve minimamente processada.

## 5.2 Pesquisa de Coliformes a 35°C

A pesquisa de coliformes totais a princípio não fazia parte do objetivo do trabalho, mas devido às primeiras análises sempre obterem uma alta contagem na prova presuntiva em VRBA, sem confirmação para coliformes termotolerantes em Caldo EC, foi decidido realizar pelo menos uma análise de cada marca para coliformes totais, totalizando 3 análises. Infelizmente o estudo não foi conclusivo, pois das 3 marcas analisadas as 3 apresentam alta contagem na prova presuntiva em VRBA, mas somente uma confirmou tanto para coliformes a 35 e a 45°C. Desta forma, a presença de colônias típicas e atípicas de coliformes em VRBA, foi devido a outro microrganismo que se desenvolveu no meio seletivo utilizado.

A Tabela 3 mostra os resultados encontrados de coliformes totais no último mês de pesquisa para as amostras de couve minimamente processadas.

**Tabela 3** – Resultados da análise de Coliformes a 35°C:

Marca	Mês 3
A	$5,4 \times 10^6$ UFC/g (est.)
B	$< 1 \times 10^1$ UFC/g
C	$< 1 \times 10^1$ UFC/g

Est.=Estimada. UFC=Unidade formadora de colônia.

Para hortaliças, não há padrão para coliformes a 35°C, e o limite máximo para coliformes a 45°C é de  $10^2$  UFC/g. Uma única amostra teve contagem de coliformes totais elevada, apresentando um valor de  $5,4 \times 10^6$  UFC/g (est.).

Gasparello (2008) em sua pesquisa de saladas de vegetais folhosos servidos “in natura” observou valores de  $1,7 \times 10^6$  UFC/g a  $8,7 \times 10^6$  UFC/g.

Segundo Junior, Gontijo e Silva (2012), embora não existam informações na legislação brasileira quanto aos limites de contagens toleradas

para coliformes totais, tais análises indicam más condições higiênicas do local, do produto e o risco da presença de patógenos fecais.

Populações de coliformes totais acima de  $1,0 \times 10^3$  NMP/g são consideradas altas para hortaliças minimamente processadas, que foram sanitizadas antes do empacotamento. Grandes populações desses microrganismos podem diminuir a vida de prateleira (GASPARELLO, 2008).

As Figuras 4 e 5 ilustram respectivamente, a prova presuntiva de coliformes em VRBA e sua prova confirmativa de coliformes totais em VBB. Na figura 4 é possível visualizar uma grande quantidade de colônias típicas (rosas) e atípicas (transparentes) indicando uma possível alta contaminação por um gênero de coliformes. Na Figura 5 aparecem tubos contendo caldo VBB, que apresentam tubos de Durhan que chegam estar boiando de tanto gás produzido pelos coliformes presentes no meio.



**Figura 4** – Prova presuntiva de coliformes.

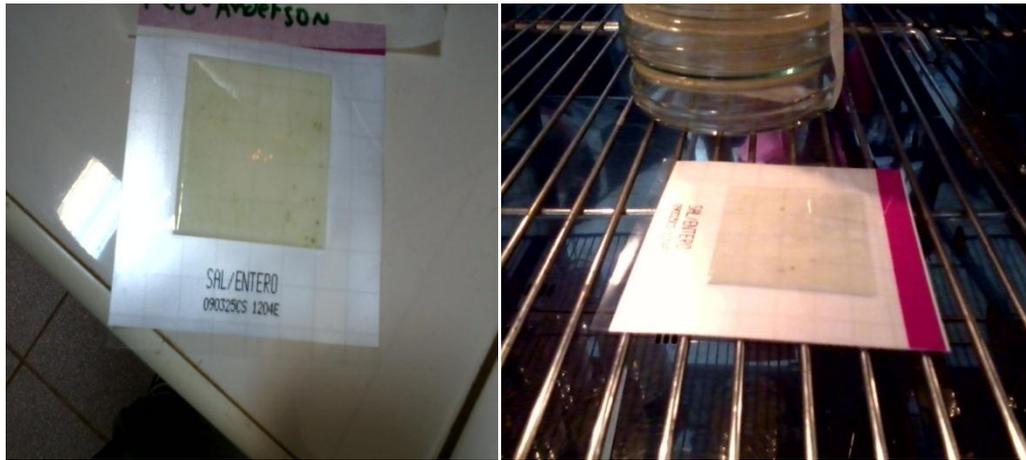


**Figura 5** – Prova confirmativa de coliformes a 35°C.

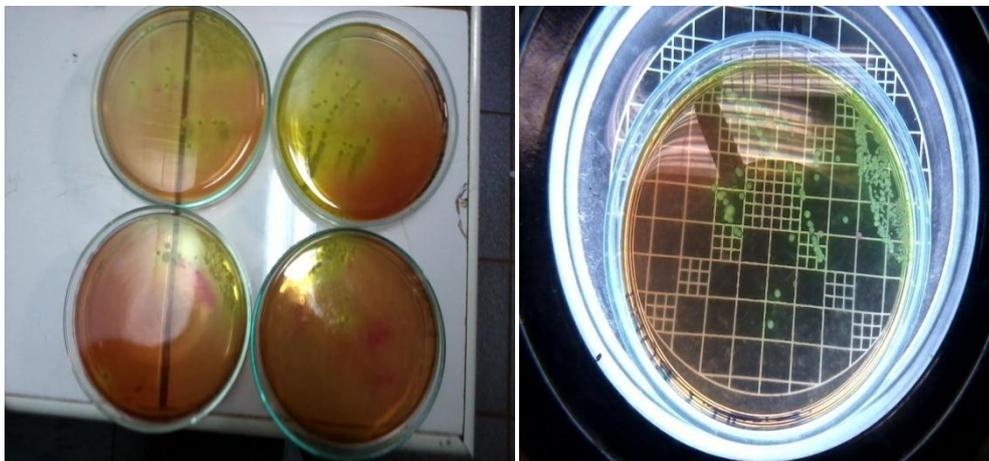
### **5.3 Pesquisa de *Salmonella sp*/25g**

Das 9 análises realizadas nenhuma apresentou presença de *Salmonella sp*. Salienta-se que todas as análises foram feitas em *pool*, do qual cada um era constituído da mistura de 3 amostras de couves do mesmo lote, e que 27 amostras de couves não apresentaram presença de *Salmonella sp*.

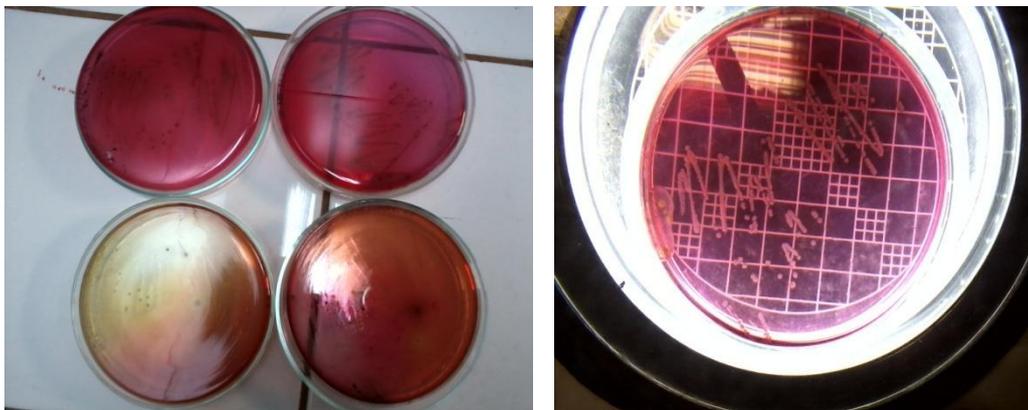
As Figuras 6, 7 e 8 apresentam as diferentes formas de análise de *Salmonella sp* realizadas durante o trabalho. Na figura 6 nos trás um petrifilme do qual não houve crescimento nenhum de colônias sendo assim resultado de ausência de *Salmonella sp*. A figura 7 apresenta colônias típicas (incolores ou de cor rosada, entre translúcidas a ligeiramente opacas) de *Salmonella sp* em ágar BPLS das quais não foram confirmadas em suas provas bioquímicas e sorológicas sendo assim o resultado foi de ausência para tal microrganismo. Por fim a Figura 8 apresenta as colônias típicas (transparentes, centro negro, halo púrpura ao redor) no ágar XLD (Ágar xilose-lisina-desoxicolato) como no BPLS as colônias apresentadas no XLD também não foram confirmadas através das provas bioquímicas e sorológicas. Portanto em nenhuma das formas de pesquisar *Salmonella sp* foi possível detectar sua presença.



**Figura 6** – Pesquisa de *Salmonella sp* em Petrifilme.



**Figura 7** – Pesquisa de *Salmonella sp* ágar BPSL.



**Figura 8** – Pesquisa de *Salmonella sp* ágar XLD.

Segundo a resolução - RDC Nº 12 de Janeiro de 2001 o padrão microbiológico para pesquisa de *Salmonella sp* é de ausência. Devido á sua importância como patógeno veiculado por alimentos a legislação brasileira (BRASIL, 2001) preconiza a pesquisa de *Salmonella sp*.

Conforme Oliveira (2008) a presença de *Salmonella sp* em hortaliças prontas para o consumo, mesmo em baixas populações, indica potencial risco à saúde dos consumidores.

De acordo com Vitti et al. (2004), condições higiênicas adequadas possibilitam a obtenção de um produto com padrão microbiológico de acordo com a legislação de alimentos. Vitti e colaboradores realizaram pesquisa em minimamente processados e também não foi detectada a presença de *Salmonella sp* em nenhuma das repetições analisadas.

Tresseler et al (2009), observou em minimamente processados, contaminação em apenas uma amostra "*in natura*". Na amostra após sanitização e ao final do período de armazenamento não foi encontrada contaminação, sendo nesse caso, a sanitização eficiente na remoção do patógeno. A pesquisa de Tresseler et al (2009) mostrou que a ausência de *Salmonella sp* se deve à sanitização eficiente e as altas contagens de outros microrganismos indica contaminação pós sanitização e contaminação cruzada.

#### **5.4 Pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva**

A Tabela 4 mostras os resultados da pesquisa de estafilococos coagulase positiva, encontrados nas amostras de couve minimamente processados.

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* apresentou contagem alta em 7 das 9 análises quando se compara ao padrão de  $10^3$ UFC/g da Resolução - RDC Nº 12 de Janeiro de 2001 na seção de hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis). O anexo D do qual diz a seguinte maneira branqueados ou cozidos, inteiras ou picados, estéveis a temperatura, refrigeradas ou congeladas ambiente, consumidas diretamente, incluindo cogumelos; polpas ou purês, refrigerados ou congelados. Este anexo não se refere exatamente ao produto desta pesquisa, mas é o que mais se assemelha

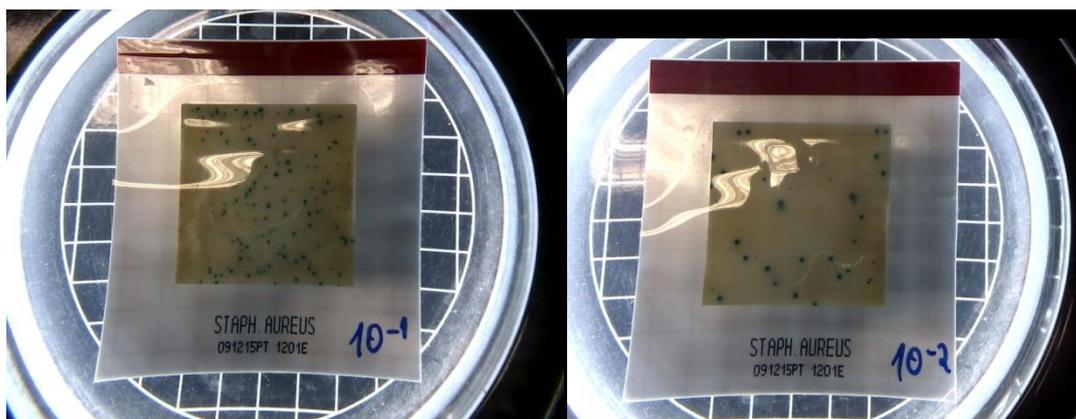
para poder fazer uma comparação, já que no anexo B da Resolução - RDC N<sup>o</sup> 12 não há pesquisa de estafilococos coagulase positiva. Esta análise é importante, já que se trata de um produto minimamente processado, pronto para consumo e no preparo ocorre a manipulação.

**Tabela 4** – Resultados da análise de estafilococos coagulase positiva:

Marca	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Média de tratamento
A	1,0x10 <sup>4</sup> UFC/g (est.)	6,4x10 <sup>4</sup> UFC/g (est.)	2,0x10 <sup>4</sup> UFC/g	3,1x10 <sup>4</sup> UFC/g±2,8x10 <sup>4a</sup>
B	<10 <sup>3</sup> UFC/g	2,9x10 <sup>3</sup> UFC/g (est.)	1,6x10 <sup>3</sup> UFC/g	1,8x10 <sup>3</sup> UFC/g±9,7x10 <sup>2a</sup>
C	<10 <sup>3</sup> UFC/g	3,8x10 <sup>3</sup> UFC/g (est.)	4,8x10 <sup>4</sup> UFC/g	1,7x10 <sup>4</sup> UFC/g±2,6x10 <sup>4a</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A Figura 9 exibe o método rápido utilizado para pesquisa de *Staphylococcus aureus*, onde se utilizou placas de Petrifilme. Segundo a 3M (2013) uma placa Petrifilme para contagem rápida de *Staphylococcus* oferece o desempenho equivalente ao Método ágar coagulase Baird-Parker. A direita podemos observar um Petrifilme com varias colônias típicas (colônias verdes) de *Staphylococcus aureus*, da qual foi inoculada a diluição 10<sup>-1</sup> e a esquerda o Petrifilme contendo a diluição 10<sup>-2</sup> a contagem estabelecida neste Petrifilme presenciou uma contagem acima do padrão observado.



**Figura 9** – Contagem de *Staphylococcus aureus* em Petrifilm.

Miguel (2008) observou valores de 1,76x10<sup>4</sup>UFC/g a 3,0x10<sup>5</sup>UFC/g mínimo e máximo respectivamente para amostras de couve minimamente processadas. Ele afirma que as boas práticas de higiene por parte de

manipuladores não foram utilizadas, sendo que ele também utilizou o padrão de  $10^3$ UFC/g como referência aos seus estudos.

Silva (2013) observou que 25% das amostras analisadas em sua pesquisa apresentaram estafilococos coagulase negativa (ECN) e 3,5% estafilococos coagulase positiva (ECP).

Na avaliação de Bruno et al. (2005), a detecção de *Staphylococcus* em alimentos está relacionada com manipulação inadequada durante o processamento.

A presença desse microrganismo indica, na matéria-prima e em alimentos, mau estado higiênico, conseqüente ao manuseio por portadores de germe (EVAGELISTA, 2001).

Ferreira (2006) diz que as toxinfecções alimentares são ocasionadas por agentes etiológicos tais como bactérias, vírus, fungos e parasitas, principalmente devido a práticas inadequadas de manipulação, matérias-primas contaminadas, falta de higiene durante preparação, além de equipamentos e estrutura operacional deficientes em alimentos que sofrem manipulação intensa no processamento.

A presença de números elevados de *S. aureus* é uma indicação de perigo potencial à saúde pública devido á enterotoxina estafilocócica, bem como a sanitização questionável, principalmente quando o processamento envolve manipulação do alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O *Staphylococcus aureus* é transmitido facilmente aos produtos, através de focos conservados por limpeza deficiente e do próprio operador, no qual o microrganismo se localiza no seu nariz, boca, pele e especialmente, em ferimentos (EVAGELISTA, 2001).

## **5.5 Pesquisa de Microrganismo Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis**

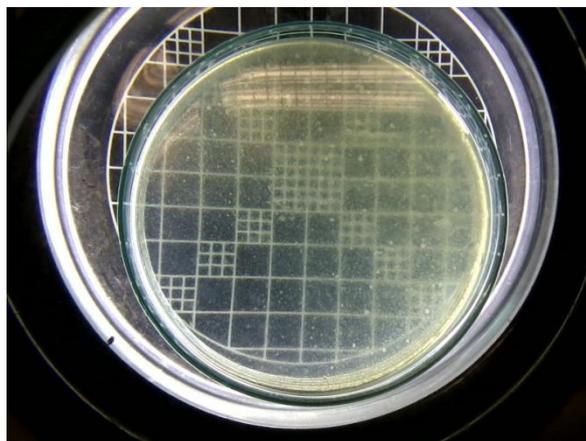
A pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis foi realizada somente 1vez pra cada marca, totalizando em 3 análises. Ela foi feita, pois a contagem padrão em placas (CPP) tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também ideia sobre seu tempo útil de conservação.

A Tabela 5 mostra os resultados encontrados para microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis no último mês de pesquisa para as couves minimamente processadas. Dos quais apresentam uma variação de  $3,3 \times 10^5$  UFC/g a  $6,8 \times 10^6$  UFC/g (est.).

**Tabela 5** – Resultados da análise mesófilos aeróbios estritos e facultativos:

Marca	Mês 3
A	$6,8 \times 10^6$ UFC/g (est.)
B	$1,7 \times 10^6$ UFC/g
C	$3,3 \times 10^5$ UFC/g

Na Figura 10 encontra-se a placa de PCA (Ágar padrão para contagem) contendo colônias típicas (colônias brancas) de mesófilos aeróbios estritos facultativos e viáveis. O número de colônias encontradas nesta placa indica uma grande contagem deste microrganismo.



**Figura 10** – Pesquisa de mesófilos aeróbios estritos facultativos viáveis.

Sabe-se que na legislação em vigor, não existe padrão para microrganismos mesófilos aeróbios estritos facultativos viáveis, mas na pesquisa de Paula et al. (2003), ela mencionou ter utilizado como padrão  $10^7$  UFC/g.

Os estudos de Silva (2006) revelam valores médios para contagem de mesófilos apresentam níveis variando de  $4,7 \times 10^5$  UFC/g a  $1,6 \times 10^8$  UFC/g nos meses de julho e março de 2005, respectivamente.

Na literatura existe uma variação em torno dos valores estabelecidos para alimentos e para os vegetais prontos para consumo. Em geral, contagens aeróbicas entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/g são comuns em vegetais prontos para consumo (JAY, 2005). Lima (2003) afirma em seu estudo que diz que a contagem de mesófilos acima de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/g indica término da vida útil dos produtos. Segundo Mossel (1982), a contagem máxima aceitável de mesófilos em vegetais frescos é de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g. No Japão, foi definido o valor  $1,0 \times 10^5$  UFC/g para alimentos, determinado por contagem em placa (APC), como sendo seguro para o consumo, embora não exista nenhum regulamento nacional de alimentos prontos para consumo (Kaneki et al., 1999). Os resultados do presente estudo mostram-se abaixo destes valores, indicando contagens normais para hortaliças prontas para consumo.

## 5.6 Pesquisa de Microrganismo Psicrotróficos

A pesquisa de microrganismos Psicrotróficos foi realizada somente 1 vez para cada marca, totalizando em 3 análises. Por se tratar de um alimento refrigerado achou que seria importante pesquisar se haveria presença de tais microrganismos. As embalagens das 3 marcas trazia consigo a informação de que as amostras de couve deveriam ser armazenadas em temperaturas de aproximadamente  $5^{\circ}\text{C}$ , sendo a faixa de temperatura para tal microrganismo em torno de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $7^{\circ}\text{C}$ .

Na Tabela 6 mostra os resultados encontrados para microrganismos psicrotróficos no ultimo mês de pesquisa para as amostras de couve minimamente processadas.

**Tabela 6** – Resultados da análise de Psicrotróficos:

Marca	Mês 3
A	$2,0 \times 10^4$ UFC/g
B	$1,6 \times 10^3$ UFC/g
C	$4,8 \times 10^4$ UFC/g

Não existe em legislação o padrão para microrganismos psicrotróficos em hortaliças minimamente processadas. Mas nos estudos de Vitti et al. (2004) a contagem inicial das bactérias psicrotróficas foi de aproximadamente

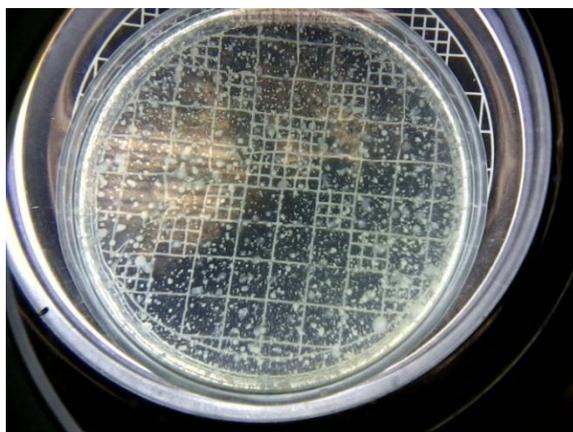
$2,62 \times 10^2$  UFC/g, ao passo que, no 10º dia de armazenamento, as contagens aumentaram para valores próximos a  $2,4 \times 10^4$  UFC/g. Vitt et al. (2004) realizou a pesquisa no dia em que os vegetais minimamente foram processados e 10 dias depois. Observou-se que os valores no dia 10 se assemelharam aos que foram encontrados na couve minimamente processada dentro do prazo de validade.

Segundo Silva (2006) em sua pesquisa com minimamente processados observou que os psicrotróficos variam entre  $7,9 \times 10^6$  UFC/g e  $2,8 \times 10^8$  UFC/g nos meses de julho e janeiro do ano de 2005, respectivamente. Os valores apresentados referem-se aos índices mais baixos e mais elevados, respectivamente.

Fantuzzi, Puschmann e Vanetti (2004) encontraram valores próximos a da pesquisa aqui presente, onde a contagem padrão inicial de microrganismos psicrotróficos, que foi de aproximadamente  $10^4$  UFC/g, não variou durante 20 dias de estocagem a 1°C e 5°C, nas amostras de repolho minimamente processados.

Oliveira (2008) afirma que as populações de bactérias aeróbias psicrotróficas encontradas em seus estudos foram elevadas, sendo maior que  $1,0 \times 10^5$  UFC/g (limite de detecção na técnica de contagem padrão em placas utilizada neste estudo) em 96,3% do total de amostras analisadas.

A Figura 11 mostra uma alta contagem de microrganismos psicrotróficos na placa de PCA essa contagem é evidenciada pelas colônias típicas (colônias brancas).



**Figura 11** – Pesquisa de microrganismos psicrotróficos.

A temperatura é um dos fatores extrínsecos mais importantes na atividade bioquímica dos microrganismos. Quanto menor for a temperatura, menor será a velocidade das reações bioquímicas ou a atividade microbiana. Em consequência, poder-se-ia considerar que tanto o congelamento como a refrigeração são melhores métodos de conservação para qualquer tipo de alimento. No entanto isso não é verdade. Alguns alimentos não podem ser estocados nem mesmo sob-refrigeração, pois sofrerão injúrias devido ao frio, tornando-se inaceitáveis para o consumo. Portanto, a temperatura na qual um alimento pode ser armazenado depende das suas características. Além disso, fatores econômicos também devem ser considerados, uma vez que a remoção de calor e a manutenção do ambiente frio controlado são de alto custo. Os alimentos perecíveis são os de maior interesse quando se considera o armazenamento em baixas temperaturas (FRANCO, LANDGRAF, 2008).

## 6. Conclusão

Em relação aos resultados obtidos neste estudo realizado em amostras de couve minimamente processadas e comercializadas em supermercados de Campo Mourão, pode-se concluir que as três marcas analisadas não apresentaram presença de *Salmonella sp.* Nas contagens para coliformes termotolerantes, uma das amostras apresentou valores acima dos padrões permitidos pela legislação. Para a pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva das 9 amostras analisadas 7 apresentaram valores muito acima do padrão utilizado para determinar sua sanidade microbiológica, indicando assim que a uma deficiência da legislação sobre os alimentos minimamente processados, visando repensar quais as formas de combater este microrganismo, deixando claro a importância da pesquisa deste microrganismo. As pesquisas adicionais realizadas somente nas 3 últimas amostras, uma de cada marca, das 3 amostras submetidas a análise de coliformes a 35°C somente uma teve sua confirmação, sendo as outras duas que apresentaram alta contagem na prova presuntiva mas não confirmaram para nenhum tipo de coliforme. Nas contagens de microrganismos mesófilos e psicrófilos encontram-se similares aos de outros estudos e até mesmo abaixo dos valores de alguns deles, sendo estes estudos comparados sempre indicando alta contagem segundo os autores.

## 7. Referências

3M. **Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem Rápida de Staphylococcus.**

Disponível em:

<[http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt\\_BR/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalog-](http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalog-)

[br/?PC\\_7\\_RJH9U5230GD8A0I8TS8AOO2C43000000\\_nid=D7BKZ3NP1MbeRNSP8PD320gl](http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalog-br/?PC_7_RJH9U5230GD8A0I8TS8AOO2C43000000_nid=D7BKZ3NP1MbeRNSP8PD320gl)>. Acesso em: 28 ago. 2013.

BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. *Ciênc. Technol. Aliment.*, v. 21, n. 2, p. 197-201, maio/ago. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001. **Resolução RDC nº 12**, de 02 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 25 de jul. de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (Dispoa). **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**, que aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 25 de jul. de 2013.

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). **B. CEPPA**, v. 23, n. 1, p. 75-84, 2005.

EVANGELISTA, José. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2001.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M. C. D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n.º 2: p. 207-211, 2004.

FERREIRA, Sandra Maria dos Santos. **Contaminação de alimentos ocasionada por manipuladores**. 2006. 47 f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos)-Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

JAY, James M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Edição. Porto Alegre: Atmed, 2005.

FRANCO, Bernadete Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. 1ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2008.

GASPARELLO, E. A. **Pesquisa de Coliformes a 35°C e 45°C, Samonelas e Estafilococos Coagulase Positiva em Saladas de Vegetais Folhosos Servidos “In Natura” em Restaurantes no município de Campo Mourão – Paraná**. Tese (Especialização) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2008.

JUNIOR, J. P.; GONTIJO, É. E. L.; SILVA, M. G. Perfil parasitológico e microbiológico de alfaces comercializadas em restaurantes Self-service de Gurupi-to. **Revista Científica do ITPAC**, v.5, n.1, 2012.

KANEKO, K. et al. Bacterial Contamination of Ready-to-eat Foods and Fresh Products en Retail Shops and Food Factories. *Journal of Food Protection*, Iowa, v. 62, n.º. 6, p. 644-649, 1999.

LANA, Milza Moreira; SANTOS, Fausto Francisco; TAVARES, Selma Aparecida; MELO, Mário Felipe de; Maria José L. F. MATOS. (2013). **Couve**. EMBRAPA Hortalças. Disponível em:

<[http://www.cnph.embrapa.br/laborato/pos\\_colheita/dicas/couve.htm](http://www.cnph.embrapa.br/laborato/pos_colheita/dicas/couve.htm)>. Acesso: 08 jul. 2013.

LIMA, K. S. C.; LIMA, A. L. S.; LUCHESE, R. H.; GOGOY, R. L. O.; SABAA-SRUR, A. U. O. Cenouras minimamente processadas em embalagens com atmosferas modificadas e tratadas com radiação gama: Avaliação microbiológica, físico-química e química. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 23, nº. 2, p. 240-250, 2003.

MIGUEL, A. A. P. **Pesquisa de Coliformes a 35°C e 45°C e Estafilococcus Coagulase Positiva em Couve Minimamente Processada, Comercializados no Município de Campo Mourão**. Tese (Especialização) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2008.

MOTTIN, Vanessa Daniele (2008). **Avaliação Microbiológica de Apresuntados, Fatiados e Comercializados em Supermercados de Porto Alegre, RS**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da Saúde Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/14244/000658790.pdf?sequence=1>>. Acesso: 25 jul. 2013.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. **Microbiologia de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1982. 375p.

NASCIMENTO, Edson Ferreira; MOLICA, Eliane Maria & MORAES, Júlio Sérgio de. **Hortalças Minimamente Processadas (Mercado e Produção)**. 1ª Edição. Brasília: EMATER-DF, 2000.

OLIVEIRA, M. A. **Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria***. Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

PAULA, P.; RODRIGUES, P. S. S.; TÓRTORA, J. C. O.; UCHÔA, C. M. A.; FARAGE, S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, nº.4, p. 535-537, 2003.

PUSCHMANN, Rolf; SOARES, Nilda de Ferreira Fátima; VANETTI, Maria Cristina D.; DANTAS, Maria Inês; CARNELOSSI, Marcelo Augusto Gutierrez; MININ, Valéria P. R.; CAMPOS, Rodrigo da Silva; BARBOSA, Rogério Lellis; SILVA, Danieele Fabíola Pereira; GOMES, André. (2013). **Tecnologia de processamento mínimo de couve**. Departamento de Biologia Vegetal; Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/novidade/eventos/semipos/texto19.pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2013.

SILVA, Regina Pavan da Silva (2006). **Avaliação Bacteriológica e Parasitológica em Hortaliças Minimamente Processadas Comercializadas em Porto Alegre – RS**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Agronomia Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/7568/000548623.pdf?sequence=1>>. Acesso: 25 jul. 2013.

SILVA, B. L. **Avaliação higiênico-sanitária de produtos minimamente processados comercializados em Botucatu/SP. Perfil genotípico e fenotípico das cepas de Staphylococcus sp, em relação à produção de biofilme e de enterotoxinas**. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

TRESSELER, J. F. M.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W.; MACHADO, T. F.; DELFINO, C. M.; SOUSA, P. H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. **Ciênc. agrotec.** v. 33 nº. spe, 2009.

VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A.; GALLO, C. R.; SCHIAVINATO, M. A.; MORETTI, C. L.; JACOMINO, A. P. Aspectos fisiológicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.10, p.1027-1032, 2004.