

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Descontaminação da superfície do coco verde por métodos  
físicos e químicos e desenvolvimento de  
*Listeria monocytogenes* em água de coco fresca**

**Eduardo Henrique Miranda Walter**  
Engenheiro de Alimentos

**Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye**  
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

**Campinas - SP  
2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP**

W171d Walter, Eduardo Henrique Miranda  
Descontaminação da superfície do coco verde por métodos físicos e químicos e desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em água de coco fresca / Eduardo Henrique Miranda Walter. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Listeria monocytogenes*. 2.Coco. 3.Água de coco.  
4.Segurança de alimentos de origem vegetal. 5.Sanitizantes.  
I.Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

cars-fea

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Listeria monocytogenes*, Coconut, Coconut water, Food safety plant foods, Sanitizers

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Maria Helena Castro Reis Passos  
Mauro Faber de Freitas Leitão  
Nélio José de Andrade

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Orientador

---

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão  
Membro

---

Prof. Dr. Nélcio José de Andrade  
Membro

---

Dra. Maria Helena Castro Reis Passos  
Membro



*“Felicidade é ter algo que fazer,  
algo que amar,  
algo que esperar.”*

*Aristoteles*

*Dedico esta conquista aos meus pais.*



## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo e de todos.

À Michele, minha amada namorada, pelo carinho, compreensão e incentivo.

Aos professores Arnaldo Kuaye e Nélio de Andrade, pela amizade e atenção dedicada a minha formação.

A Dirce Kabuki, Maria Helena Passos e Mauro Leitão, pelo interesse e contribuições tanto no planejamento quanto na correção deste trabalho.

Aos professores e pesquisadores Caio Sanchez, Hilary de Menezes, José de Assis Faria, Luiz Viotto e Nelson Horácio Garcia, pelo incentivo e colaboração técnica.

Aos funcionários Ana Lourdes Gandara, Cláudia Romano, Creusa Nomura, Denir Mendes, Divinair Silva, Edson Davi, Geraldo da Silva, José Marcondes, José Gallani, Márcio Oliveira, Maria Elizabete Dias, Marlene Pires e Samuel da Silva, pelo carinho e colaboração técnica.

A Andréa Trolller, Wilmer Edgar Penha, Cristina Takeiti, Fernando Camargo, Gabriela Torezan, Giovanilton Ferreira, Luciana Esper, Maristela do Nascimento, Paulo Lenço, Rodrigo Petrus, pela amizade e ajuda na execução deste trabalho.

A Ana Paula, Carolina, César, Cibele, Deyse, Fátima, Janaína, Leonel, Kathleen, Fábio, Guillaume, Renata, Renata Torrezan, Wilson, pela amizade e por compartilhar a vida acadêmica.

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de estudos concedida.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	xi
<b>SUMMARY</b> .....	xiii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	5

### CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica

<b>Contaminação e Controle de Microrganismos Patogênicos em Frutas e Hortaliças</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	11
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2. <b>MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS NO ECOSISTEMA VEGETAL</b> .....	13
2.1. Características físicas.....	13
2.2. Características químicas.....	14
2.3. Características ambientais.....	15
3. <b>MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS EM FRUTAS E HORTALIÇAS</b> .....	17
3.1. Bactérias indicadoras de qualidade.....	18
3.2. Vírus patogênicos.....	19
3.3. Fungos micotoxigênicos.....	20
4. <b>PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE FRUTAS E HORTALIÇAS</b> .....	21
5. <b>HIGIENIZAÇÃO DE FRUTAS E HORTALIÇAS</b> .....	23
5.1. Sanitizantes químicos.....	25
6. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29

### CAPÍTULO II

<b>Descontaminação da Superfície do Coco Verde por Métodos Físicos e Químicos</b> .....	35
<b>RESUMO</b> .....	37
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	38
2. <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40

2.1. Cocos verdes.....	40
2.2. Preparo dos frutos.....	40
2.3. Microrganismos-teste.....	40
2.4. Preparo do inóculo.....	41
2.5. Procedimento de inoculação e secagem.....	41
2.6. Preparo dos tratamentos.....	42
2.7. Execução dos tratamentos.....	44
2.8. Preparo das amostras para análise.....	45
2.9. Análises microbiológicas.....	45
2.10. Investigação de substâncias inibidoras no fluído vegetal.....	46
2.11. Análise estatística.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

### CAPÍTULO III

<b>Desenvolvimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em Água de Coco Fresca</b> .....	61
RESUMO.....	63
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1. Cocos verdes.....	66
2.2. Descontaminação dos frutos e extração da água de coco.....	66
2.3. Teste de esterilidade da água de coco.....	67
2.4. Microrganismos-teste.....	67
2.5. Preparo do inóculo.....	67
2.6. Inoculação e quantificação de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	68
2.7. Análises químicas e físico-químicas.....	68
2.8. Modelagem e análise estatística.....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>81</b>

## RESUMO GERAL

A composição química da água de coco, com altos teores de açúcares e sais minerais, pode propiciar condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano, principalmente das bactérias. O processamento industrial da água de coco virtualmente elimina todos os microrganismos que possam causar algum tipo de doença humana. Entretanto, as características sensoriais da água de coco *in natura* ou envasada a fresco são consideradas superiores à da bebida pasteurizada ou comercialmente estéril. Além disso, a bebida fresca é mais barata que a industrializada. A segurança dos produtos frescos depende fundamentalmente da prevenção de sua contaminação, associada a uma refrigeração adequada durante o transporte e armazenamento. Os objetivos deste estudo foram os seguintes: i) avaliar a eficácia da imersão em água e a sanitização com hipoclorito de sódio, ácido peracético e vapor superaquecido, na descontaminação da superfície do coco verde, utilizando-se *Listeria monocytogenes* como microrganismo-teste; ii) desenvolver a flambagem como tratamento de descontaminação da superfície do coco verde; e iii) estudar o comportamento de *L. monocytogenes* inoculado experimentalmente em água de coco fresca mantida sob diferentes condições de temperatura. Os tratamentos químicos consistiram na imersão dos frutos em água destilada estéril, solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L e pH 6,5) e solução de ácido peracético (80 mg/L) por 2 min. Todos os tratamentos químicos diferiram significativamente ( $\alpha=0,05$ ) entre si, ressaltando-se que a imersão em água, solução de hipoclorito de sódio e solução de ácido peracético reduziram a população inicial de *L. monocytogenes* em 1,55; 3,84; e 4,47 log UFC/superfície-teste do fruto, respectivamente. No tratamento com vapor superaquecido, a superfície-teste foi exposta ao vapor direto (117 °C) por 7 s, e no tratamento de flambagem à chama direta (1.150 °C), por 3 s. Ambos os tratamentos físicos reduziram mais de 5,69 log UFC de *L. monocytogenes*/superfície-teste do fruto. Os caldos de enriquecimento de amostras submetidas ao vapor superaquecido turvaram após 24 h de incubação a 35 °C. Nenhum microrganismo foi detectado dos caldos de enriquecimento provenientes das amostras submetidas à flambagem, e incubados por 48 h.

Assim, a flambagem foi considerada o tratamento mais eficaz na descontaminação da superfície do coco verde. O desenvolvimento de *L. monocytogenes* em amostras de água de coco fresca (pH 4,9) submetida a diferentes temperaturas de incubação (4, 10 e 35 °C) também foi analisado. A população média de *L. monocytogenes* na água de coco experimentalmente inoculada foi de 2,95 log UFC/mL, e as populações máximas alcançadas na fase estacionária das amostras incubadas a 4, 10 e 35 °C foram de até 7,08; 7,72; e 8,32 log UFC/mL, respectivamente. As curvas de crescimento foram ajustadas utilizando-se a equação de Gompertz modificada. Em amostras de água de coco incubadas a 4, 10 e 35 °C, os menores tempos de latência (fase lag) foram de 12,7 dias, 4,2 dias e 3,8 h e os menores tempos de geração, de 2,7 dias, 10,7 h e 49,3 min, respectivamente. Assim, a água de coco é um substrato propício à sobrevivência e desenvolvimento de *L. monocytogenes*. A refrigeração pode prolongar o tempo de latência de *L. monocytogenes* em água de coco. Já o abuso de temperatura pode aumentar consideravelmente o nível desse perigo potencial. Os resultados deste trabalho poderão ser aplicados no estabelecimento de Boas Práticas de Fabricação – BPF e de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC tanto da água de coco fresca quanto da bebida processada.

## SUMMARY

The chemical composition of coconut water, with high levels of sugars and minerals, may offer favorable conditions for the microbial development, mainly of bacteria. The industrial processing of coconut water virtually eliminates all microorganisms that may cause human illness. However, the sensorial characteristics of *in natura* or fresh coconut water are considered superior than the pasteurized one or the commercially sterile drink. Moreover, the fresh drink is cheaper than the industrialized one. The fresh produce safety depends primarily on the prevention of its contamination, associated to a strict refrigeration control during transport and storage. The objectives of these study were the following: i) to evaluate the effectiveness of immersion in water and sanitation treatments with sodium hypochlorite, peroxyacetic acid and overheated steam for decontamination of tender coconut surface, using *Listeria monocytogenes* as a test microorganism; ii) to develop a procedure of fire flame as a decontamination treatment of tender coconut surface; iii) to study the behavior of *L. monocytogenes* experimentally inoculated in fresh coconut water incubated under different conditions. The chemical treatments consisted in the immersion of the fruits in sterile distilled water, solution of sodium hypochlorite (200 mg/L and pH 6.5) and solution of peroxyacetic acid (80 mg/L) for 2 min. The chemical treatments differed significantly ( $\alpha=0,05$ ) between itself, and the immersion in water, solution of sodium hypochlorite and solution of peroxyacetic acid caused a reduction of the initial population of *L. monocytogenes* of 1.55, 3.84, and 4.47 log CFU/test surface of the fruit, respectively. In the fire flame treatment the test surface was exposed to direct flame (1,150 °C) for 3 s and in the overheated steam treatment to direct steam (117 °C) for 7 s. The physical treatments caused a reduction of > 5.69 log CFU/test surface of the fruit. The enrichment broths with samples from overheated steam treatment became turbid after 24h of incubation at 35 °C. No microorganism was detected in the enrichment broths with samples from fire flame treatment, and incubated for 48 h. Thus, the fire flame treatment was considered the most efficient in the decontamination of tender coconut surface. The development of *L. monocytogenes* in samples of fresh coconut water (pH 4.9) incubated under

different temperatures (4, 10 and 35 °C) was also analyzed. The average population of *L. monocytogenes* in the coconut water experimentally inoculated was 2.95 log CFU/mL. The maximum population density reached in the stationary phase of the samples incubated at 4, 10 and 35 °C were up to 7.08, 7.72 and 8.32 log UFC/mL, respectively. The growth curves were adjusted with the modified Gompertz equation. The shortest lag phase duration of *L. monocytogenes* in the samples of coconut water incubated at 4, 10 and 35 °C were 12.7 days, 4.2 days and 3.8 h and the shortest generation times were 2.7 days, 10.7 h and 49.3 min, respectively. Thus, the coconut water is a propitious substratum to the survival and development of *L. monocytogenes*. The refrigeration may extend the lag phase duration of *L. monocytogenes* in coconut water and the temperature abuse may considerably increase the level of this potential hazard. The results of this work could be used for the establishment of Good Manufacturing Practices – GMP and Hazard Analysis and Critical Control Points – HACCP for fresh coconut water and the processed drink.

## INTRODUÇÃO GERAL

A água de coco é uma bebida apreciada nos países tropicais, principalmente nas regiões litorâneas, onde o coqueiro faz parte da paisagem. No Brasil, com a recente disponibilização do coco verde (*Cocos nucifera* L.) em todo o mercado nacional e a oferta de água de coco em diversos pontos de venda, tem ocorrido aumento expressivo na demanda desses produtos. Parte desse crescimento pode ser atribuída à tendência de consumo de bebidas de frutas não carbonatadas e à crescente atenção com a saúde.

A cocoicultura destina-se à exploração extensiva do fruto, apesar de todas as partes do coqueiro terem alguma utilidade (MEDINA et al., 1980; ARAGÃO et al., 2002). Essa cultura é perene, gerando emprego e renda o ano todo. Na última década, a produção nacional de coco quase se quadruplicou, e em 2001 o Brasil passou a ser o quarto maior produtor mundial, com 4,1% da produção, atrás de Indonésia, Filipinas e Índia que, juntos, responderam por 73,3% da produção (FAO, 2003).

A água de coco é o albúmem líquido que preenche a cavidade central do coco, funcionando como reservatório de precursores para o desenvolvimento do albúmem sólido (JAYALEKSHMY et al., 1986), que por sua vez nutre o embrião localizado no seu interior. Conseqüentemente, a água de coco participa da maturação e germinação da fruta, tendo sua composição modificada durante esse processo (CHILD, 1964). Os principais constituintes químicos da água de coco são os açúcares e sais minerais; já os lipídios e substâncias nitrogenadas estão presente em pequenas concentrações (JAYALEKSHMY et al., 1986; SREBERNISH, 1998; TAVARES et al., 1998).

A água de coco é consumida tanto na forma tradicional, diretamente do fruto, quanto acondicionada em embalagem, sendo comercializada na forma fresca ou industrializada. Sua industrialização apresenta muitas vantagens, como: menor volume e peso transportado e armazenado; conveniência no manuseio e consumo; congregação na coleta e disposição do pericarpo do fruto. Outros pontos positivos da industrialização, quando da obtenção da bebida por processo

tecnológico adequado, seriam relacionados à melhoria da segurança microbiológica e ao aumento do período de conservação da água de coco. Apesar dessas adequações à comercialização e ao consumo, as características sensoriais da água de coco *in natura* ou envasada a fresco são consideradas superiores às da bebida pasteurizada ou comercialmente estéril (ARAÚJO et al., 2000; FRASSETTI et al., 2000), e a bebida fresca é mais barata que a industrializada.

A água de coco no estado natural é geralmente considerada estéril. Entretanto, existem relatos da presença de bactérias, geralmente em baixas concentrações, dentro de frutas e hortaliças aparentemente saudáveis (SAMISH et al., 1963; MENELEY; STANGHELLINI, 1974). Existem várias fontes potenciais de microrganismos deteriorantes e patogênicos na produção da água de coco fresca, dentre as quais, as mais comuns são a superfície do fruto, dos equipamentos e os manipuladores. Entretanto, poeira, pragas e qualquer material que entre em contato com o fruto ou superfície de contato da água de coco têm de ser considerados (PARISH, 1997).

Exames microbiológicos da água de coco fresca, apresentados em alguns estudos, indicam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias na sua obtenção e comercialização. *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* foram encontrados em populações de até  $1,6 \times 10^5$  UFC/mL (LEITE et al., 1998) e  $8,0 \times 10^4$  UFC/mL (HOFFMANN et al., 2002) em água de coco comercializada sob refrigeração, respectivamente. Já Melo e outros (2003) detectaram *Escherichia coli* e *Salmonella* na bebida não-pasteurizada. Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura consultada de casos ou surtos de doenças associadas ao consumo da água de coco.

A segurança da água de coco fresca depende, fundamentalmente, da prevenção de sua contaminação, associada a uma adequada refrigeração durante o transporte e armazenamento. *Listeria monocytogenes* é potencialmente preocupante em produtos frescos e armazenados sob refrigeração, devido à sua capacidade de se desenvolver nessas condições e à sua ampla distribuição

ambiental (RENTERGHEM et al., 1991). A contaminação do coco verde pode ser agravada pelo contato com o solo após a colheita. Além disso, esse microrganismo possui a habilidade de colonizar, desenvolver e persistir em equipamentos e instalações, sobrevivendo por mais tempo em condições ambientais adversas, se comparado com muitas das bactérias patogênicas não esporogênicas de relevância para a saúde pública (FENLON, 1999). As listerioses estão associadas a uma alta taxa de mortalidade entre alguns grupos de risco, incluindo mulheres grávidas, neonatos e pessoas com o sistema imunológico comprometido (SLUTSKER; SCHUCHAT, 1999).

Existem diversos métodos físicos, químicos e biológicos sendo investigados e utilizados para a redução da microbiota de frutas e hortaliças. Cada método apresenta vantagens e desvantagens distintas, dependendo do tipo de produto, procedimento de higienização e outras variáveis. Entretanto, antes de se escolher o procedimento mais efetivo de descontaminação dos produtos frescos, é necessário considerar a prevenção de sua contaminação por microrganismos patogênicos, níveis perigosos de resíduos químicos e contaminantes físicos. Como isso não é sempre possível, a higienização de muitos produtos frescos prevalece de importância fundamental para a sua segurança e qualidade (PARISH et al., 2003).

Atualmente não existe nenhum tratamento que, virtualmente, elimine todos os microrganismos patogênicos de frutas e hortaliças sem ocasionar alterações sensoriais indesejáveis no produto ou em sua superfície. A limitação da sanitização química da superfície das frutas e hortaliças pode ser atribuída diversos fatores, incluindo a molhagem incompleta da camada de cutícula (BRACKETT, 1987), a irregularidade superficial, a localização de microrganismos em estruturas protetoras (BURNETT; BEUCHAT, 2000) e a sensibilidade dos produtos frescos a tratamentos severos. Nos produtos minimamente processados ou nos frutos destinados à produção de sucos, em que ocorre a remoção do pericarpo da fruta ou casca da hortaliça, podem-se aplicar tratamentos mais severos, a exemplo de água aquecida, vapor d'água ou flambagem (chama), sem alterações sensoriais indesejáveis do produto.

Os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- Determinar a eficácia da imersão em água e da sanitização com vapor superaquecido, hipoclorito de sódio e ácido peracético na descontaminação da superfície do coco verde, utilizando-se *L. monocytogenes* como microrganismo-teste.
- Desenvolver e avaliar a flambagem como tratamento de descontaminação da superfície do coco verde.
- Estudar o comportamento de *L. monocytogenes* inoculado experimentalmente em água de coco fresca, estéril e mantida em diferentes condições de temperatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, W. M.; RESENDE, J. M.; CRUZ, E. M. O.; REIS, C. S.; SAGGIN, O. J.; J. A. ; MOREIRA, W. A.; PAULA, F. R.; LIMA FILHO, J. M. P. Fruto do coqueiro para consumo natural. In: **Coco**: Pós-Colheita. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 19-25. (Frutas do Brasil, 29)

ARAÚJO, A. H.; FONTENE, A. M. M.; MOTA, A. P. M.; DANTAS, F. F.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Análise sensorial da água de coco in natura em comparação com a pasteurizada. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p. 3.44.

BRACKETT, R. E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 999-1003, 1987.

BURNETT, S. L.; BEUCHAT L. R. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 281-287, 2000.

CHILD, R. **Coconuts**, London: Longmans, Green, 1964. p. 216.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT Database Agricultural**. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 15 ago. 2003.

FENLON, D.R. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: **Listeria, Listerioses and Food Safety**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 21-38

FRASSETTI, J.; TÓRTORA, J. C. O.; GREGÓRIO, S. R. Aceitação da água de coco in natura e processada. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p. 3.87.

HOFFMANN, F. L.; COELHO, A. R.; MANSOR, A. P., TAKAHASHI, C. M.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de amostras de água de coco vendidas por ambulantes na cidade de São João do Rio Preto – SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 87-92, 2002.

JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C.; NARAYANAN, C.S.; MATHEW, A.G. Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. **Journal of Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 203-207, 1986.

LEITE, C. C.; SANTANA, L. R. R.; SANT`ANA, M. E. B.; ASSIS, P. N. Avaliação microbiológica da água de coco produzida e comercializada na cidade de Salvador - BA. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16, 1998, Rio de Janeiro. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

MEDINA, J. C.; GARCIA, J. L. M.; DE MARTIN, Z. J.; KATO, K.; TERUO, P.; TURRATTI, J. M.; SANTOS, L.C.; SILVA, M. T. C.; CANTO, W. L.; BICUDO NETO, L. C.; MORETI, V. A. **Coco**: da cultura ao processamento e comercialização. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1980. 285 p. (Série Frutas Tropicais - 5)

MELO, N. P. M.; CARDONHA, A. M. S.; OLIVEIRA, A. C. F. Qualidade microbiológica das águas de coco envasadas e comercializadas na cidade de Natal – RN. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 101/105, p. 113-114, 2003.

MENELEY, J.C.; STANGHELLINI, M.E. Detection of enteric bacteria within locular tissue of healthy cucumbers. **Journal of food Science**, v. 39, n. 6, p. 1267-1268, 1974.

PARISH, M. E. Public health and nonpasteurized fruit juices. **Critical review in microbiology**, v. 23, n. 2, p. 109-119, 1997.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRETT, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. **Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce** In: INSTITUTE OF FOOD

TECHNOLOGISTS. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Chicago, 2003. v. 2. Disponível em: <<http://www.ift.org/cms/?pid=1000384>>. Acesso em: 16 fev. 2004.

RENTERGHEM, B. VAN; HUYSMAN, F.; RYGOLE, R. E VERSTRAETE, W. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 3, p. 211-217, 1991.

SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. The microflora within the tissue of fruit and vegetables. **Journal of Food Science**, v. 28, n. 3, p. 259-266, 1963.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listerioses in humans. In: **Listeria, Listerioses and Food Safety**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 75-96.

SREBERNISH, S.M. **Caracterização física e química da água de fruto de coco (*Cocos nucifera*), variedades Gigante e Híbrido PB-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco**. 1998. 198p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

TAVARES, M.; CAMPOS, N.C.; NAGATO, L.A.F.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; CARVALHO, M.F.H.; ARAGÃO, W.M. Estudo da composição química da água de coco-anã verde em diferentes estágios de maturação In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16, 1998, Rio de Janeiro. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p.1262-1265.



**CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica**

**Contaminação e Controle de Microrganismos Patogênicos em Frutas e Hortaliças**



## **Contaminação e Controle de Microrganismos Patogênicos em Frutas e Hortaliças**

### **RESUMO**

As frutas e hortaliças são componentes tradicionais da dieta brasileira, e seu consumo rotineiro tem sido incentivado em diversos países. Isso vem evidenciando a importância dos produtos frescos como fontes potenciais de doenças alimentares. O processamento de frutas e hortaliças frescas geralmente omite uma etapa efetiva de eliminação microbiana, resultando em produtos que naturalmente carregam microrganismos, alguns deles potencialmente perigosos para a saúde humana. Esse perigo pode ser ampliado nos produtos minimamente processados e nos sucos, cujo processamento tipicamente envolve o contato humano, a imersão em água e o corte, enquanto a sua distribuição e comercialização requerem uma vida útil de vários dias. Na investigação de medidas de controle, uma etapa fundamental é a análise da natureza dos microrganismos patogênicos na cadeia alimentar. No ambiente agrícola, o solo, a água, os animais e os agricultores podem contribuir de várias maneiras para a contaminação das frutas e hortaliças. Após a colheita, a água, os manipuladores e as superfícies de contato são particularmente preocupantes. A higienização pode reduzir a microbiota de frutas e hortaliças, mas a sua eficácia é limitada por diversos fatores, incluindo a irregularidade da superfície dos vegetais, a hidrofobicidade da camada de cutícula, a localização de microrganismos em estruturas protetoras e a sensibilidade dos produtos frescos a tratamentos severos. A refrigeração e o armazenamento sob atmosfera modificada retardam o desenvolvimento microbiano, mas alguns microrganismos patogênicos podem se adaptar a essas condições. Conseqüentemente, a segurança dos produtos frescos depende desde a prevenção de contaminações até a implementação de métodos eficientes de descontaminação e conservação.

## 1. INTRODUÇÃO

As frutas e hortaliças são componentes tradicionais da dieta brasileira e seu consumo rotineiro tem sido incentivado em diversos países. A demanda por frutas e hortaliças vem aumentando à medida que os consumidores as percebem como alimentos saudáveis, saborosos, convenientes e frescos. Conseqüentemente, a importância relativa desses produtos frescos como fontes potenciais de doenças alimentares tem se tornado evidente. No Brasil, não foram encontradas estimativas sobre a prevalência ou incidência de doenças alimentares associadas ao consumo de frutas e hortaliças. Mas os produtos minimamente processados têm despertado o interesse da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA e de institutos de defesa dos direitos dos consumidores, como é o caso do Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor – IDEC (MORETTI, 2004). Nos Estados Unidos, as frutas e hortaliças foram o segundo veículo mais freqüente de surtos alimentares cujo agente etiológico foi identificado, de acordo com uma compilação de dados epidemiológicos realizada entre 1990 e 2003 pelo Center for Science in the Public Interest – CSPI em 2004. *Salmonella*, vírus similares ao Norwalk e *Escherichia coli* foram os perigos mais comuns associados a esses surtos (CSPI, 2004).

A contaminação das frutas e hortaliças frescas é preocupante, pois, anteriormente ao seu consumo, esses produtos não são submetidos a nenhum tipo de tratamento, como o cozimento, que efetivamente destrua as células vegetativas de microrganismos patogênicos. Esse perigo pode ser ampliado nos produtos minimamente processados e nos sucos, cujo processamento tipicamente envolve o contato humano, a imersão em água e o corte (BRACKETT, 1999), enquanto a sua distribuição e comercialização requerem uma vida útil de vários dias (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994).

A prevenção da contaminação das frutas e hortaliças por perigos físicos, químicos e principalmente biológicos é um pré-requisito fundamental na garantia da segurança e qualidade dos produtos frescos. Entretanto, mesmo nas melhores condições de produção e processamento, a contaminação dos produtos frescos é

praticamente inevitável (NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS - NACMCF, 1999). Portanto, medidas de controle devem ser tomadas para a descontaminação e prevenção do desenvolvimento de microrganismos patogênicos nas frutas e hortaliças.

## **2. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS NO ECOSISTEMA VEGETAL**

Apesar de a presença de microrganismos patogênicos nas frutas e hortaliças sadias ser considerada transiente em relação à microbiota residente, esses produtos são reconhecidos como veículos de perigos biológicos pelo menos desde o início do século XX (PARISH, 1997). As frutas e hortaliças apresentam uma diversidade de ecossistemas vegetais e esse sistema é composto por tecido vegetal, ambiente e organismos (LUND, 1992). A prevenção e o controle da contaminação de frutas e hortaliças partem da tentativa de compreender as características fundamentais do ecossistema vegetal e o efeito das intervenções externas no comportamento dos microrganismos patogênicos.

### **2.1. Características físicas**

A epiderme vegetal é a barreira primária contra infecções microbianas, insetos e danos físicos em frutas e hortaliças. Essa estrutura é coberta por multicamadas hidrofóbicas que formam a cutícula (1-15  $\mu\text{m}$  de espessura) (FRANK, 2001). A distribuição dos microrganismos na superfície vegetal está relacionada com a molhabilidade de sua superfície. A diferença de adesão microbiana entre a alface e o repolho, por exemplo, é parcialmente atribuída a diferenças na capacidade de retenção de água superficial dessas folhosas ou na hidrofobicidade das camadas de cutícula (LEBEN, 1988 apud LUND, 1992). A superfície vegetal, apesar de ser aparentemente lisa, consiste de uma estrutura irregular. A adesão e colonização microbianas são facilitadas por poros (estômatos e lenticelas), irregularidades (tricomas quebrados, fendas na cutícula) e injúrias superficiais (FRANK, 2001). A adesão de células microbianas na superfície vegetal e a sua localização em estruturas protetoras podem dificultar a

sua remoção ou aumentar a sua resistência a tratamentos antimicrobianos (BURNETT; BEUCHAT, 2000). Essa situação pode ser agravada em produtos com uma grande área superficial, como as verduras (LEBEN, 1988 apud LUND, 1992).

Os microrganismos patogênicos podem sobreviver nas superfícies não injuriadas das frutas e hortaliças, mas o seu desenvolvimento é incomum. Isso é parcialmente atribuído à típica incapacidade dos microrganismos patogênicos em produzir enzimas necessárias à degradação da epiderme vegetal, o que restringe a disponibilidade de nutrientes e água (HARRIS et al., 2003). Entretanto, o desenvolvimento da microbiota residente nos vegetais pode comprometer a integridade da epiderme e alterar o pH do meio, aumentando a probabilidade de sobrevivência e desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Em uma análise de *Salmonella* em frutas e hortaliças que estavam sadias e deterioradas, Wells e Butterfield (1997) detectaram essa bactéria principalmente nos produtos deteriorados.

A possibilidade de sobrevivência e desenvolvimento de microrganismos patogênicos é consideravelmente aumentada quando a barreira protetora da epiderme é rompida. Esse rompimento pode ocorrer de várias maneiras: por injúrias mecânicas incidentais; por animais; por microrganismos; e por cortes propositais, como nas frutas e hortaliças minimamente processadas. O corte das frutas e hortaliças expõe os tecidos vegetais internos, transfere os microrganismos da superfície do produto intacto para os tecidos internos e libera os fluidos vegetais das células injuriadas (HARRIS et al., 2003).

## **2.2. Características químicas**

A superfície das frutas e hortaliças possui uma microbiota residente que normalmente subsiste em quantidades traços de nutrientes, incluindo carboidrato, proteína, sais minerais e umidade, oriundos da exsudação vegetal ou da condensação ambiental. Muitos vegetais têm a sua superfície coberta com protuberâncias tubulares denominadas tricomas. As glândulas dos tricomas

secretam substâncias químicas na superfície dos vegetais com atividade antimicrobiana e repelente a insetos. Outras substâncias oriundas da poluição ambiental e do controle agroquímico podem interferir na microbiota residente e contaminante na superfície dos vegetais (SPURR, 1994).

Alguns microrganismos similares são geralmente encontrados em frutas e hortaliças. Entretanto, a composição química de cada tipo de vegetal pode diferenciar a microbiota residente e contaminante. Nos vegetais com pH próximo ao neutro, como muitas das hortaliças, as bactérias estão geralmente presentes em grande abundância. Nessas condições, as bactérias tendem a se desenvolver mais rápido que os fungos. Até pouco tempo atrás era de aceitação geral que as frutas de alta acidez e baixo pH apresentavam um risco desprezível. Essa consideração fundamentava-se no efeito antagonista dos ácidos e do pH sobre a maioria das bactérias. Apesar de essas condições prevenirem o desenvolvimento de muitos microrganismos patogênicos, o produto pode estar contaminado com perigos biológicos em níveis suficientes para causar doenças. Alguns microrganismos patogênicos como *E. coli* (GOODSON; ROWBURY, 1989), *Listeria monocytogenes* (KROLL; PATCHETT, 1992) e *Salmonella* Typhimurium (FOSTER; HALL, 1991) podem se adaptar a condições de acidez que normalmente seriam letais. Além disso, existem evidências de que o desenvolvimento de microrganismos patogênicos em certas condições de pH subletais pode aumentar a sua virulência e desencadear mutações adaptativas que selecionam cepas mais resistentes a outras condições estressantes (ARCHER, 1996).

### **2.3. Características ambientais**

As condições ambientais no campo são consideradas tipicamente inóspitas para a sobrevivência e desenvolvimento de muitos microrganismos. Isso é parcialmente atribuído à incidência de radiação luminosa e às flutuações de temperatura e umidade no campo (SPURR, 1994). Após a colheita da fruta e hortaliça, o comportamento dos microrganismos, incluindo os patogênicos,

depende basicamente da temperatura, umidade, atmosfera e características intrínsecas do vegetal (HARRIS et al., 2003).

A refrigeração é tipicamente utilizada para retardar a respiração, a senescência, o escurecimento, a perda de umidade e o desenvolvimento microbiano nos produtos frescos (SEYMOUR; APPLETON, 2001). Entretanto, os microrganismos geralmente sobrevivem a baixas temperaturas, existindo aqueles psicrotróficos que são capazes de se desenvolver sob refrigeração, mesmo que a uma velocidade mais lenta que a da temperatura ambiente. Alguns desses microrganismos são patogênicos, tais como cepas de *Clostridium botulinum* não-proteolíticas, *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* (PARISH et al., 2003). Outro microrganismo preocupante nos produtos refrigerados são os vírus. Existem evidências de que os vírus entéricos são capazes de persistir em diferentes tipos de superfícies, porosas ou lisas, por períodos de mais de 30 dias, sendo na temperatura de 4 °C observado maior sobrevivência do que a 20 °C (ABAD et al., 1994). Uma prática comum em laboratórios que trabalham com vírus é a preservação destes sob congelamento (ICMSF, 1996). Apesar disso, o controle da temperatura é crítico para a segurança dos produtos frescos.

A utilização de embalagens com atmosfera modificada em conjunto com a refrigeração ainda não é considerada tecnologicamente segura. Assim como na refrigeração, as embalagens com atmosfera modificada podem favorecer o desenvolvimento dos microrganismos patogênicos em detrimento da atividade de outros microrganismos competidores, de modo que o produto não apresente sinais de deterioração e seja consumido (HARRIS et al., 2003). *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* e *L. monocytogenes* são minimamente afetados por níveis de CO<sub>2</sub> abaixo de 50%. Altos níveis de O<sub>2</sub> (80-90%) estimulam o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, como *E. coli* e *L. monocytogenes* (AMANATIDOU et al., 1999).

### 3. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM FRUTAS E HORTALIÇAS

Virtualmente, qualquer tipo de alimento é passível de se tornar contaminado por microrganismos patogênicos, mas isso não implica necessariamente ocorrência de doenças humanas (BRACKETT, 1999). Apesar de vários microrganismos patogênicos terem sido detectados numa diversidade de frutas e hortaliças (HARRIS et al., 2003), apenas alguns produtos frescos foram implicados na veiculação de doenças (NACMCF, 1999). Nos Estados Unidos, ocorreram grandes surtos associados ao consumo de melão, tomate, framboesa, alface, cebola, broto de alface e sucos de maçã e laranja (NACMCF, 1999). Entre 1990 e 2003, *Salmonella*, vírus similares ao Norwalk e *E. coli* foram os perigos mais comuns em surtos de doenças veiculadas por alimentos cujo agente etiológico foi identificado (CSPI, 2004). Entretanto, a perecibilidade dos alimentos e a complexidade da cadeia produtiva de frutas e hortaliças dificultam a associação dos produtos frescos com a veiculação de doenças nas investigações epidemiológicas (HARRIS et al., 2003).

Alguns microrganismos só podem causar doenças se ingeridos em altas concentrações, por exemplo *C. perfringens*, ou quando encontram condições favoráveis para se desenvolver e produzir toxinas, como *C. botulinum*, *Bacillus cereus* emético ou *Staphylococcus aureus*. Porém, em muitos casos a dose infectiva é relativamente baixa. Conseqüentemente, a contaminação do alimento e a sobrevivência do microrganismo patogênico até o momento do consumo podem implicar doença. Na veiculação de vírus ou parasitas, por exemplo, não ocorre o desenvolvimento microbiano nos alimentos (HARRIS et al., 2003). Além disso, deve-se considerar que, na maioria dos casos, a dose infectiva é dependente da suscetibilidade individual das pessoas (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS – IFT, 2000).

Estudos epidemiológicos evidenciam que as doenças veiculadas por frutas e hortaliças são transmitidas por uma variedade de bactérias, vírus e parasitas (NACMCF, 1999). Apesar de esses organismos apresentarem uma ampla diversidade fisiológica, eles compartilham de uma característica comum: a sua

fonte primária é o ambiente entérico, ou seja, eles são encontrados no trato intestinal e material fecal de seres humanos e animais. Exceções incluem: *C. botulinum*, usualmente isolado do solo, ambiente aquático e matéria orgânica em decomposição; *B. cereus*, amplamente distribuído na natureza, sendo o solo o seu reservatório natural; e *L. monocytogenes*, prontamente isolado de fezes humanas e animais, assim como em ambientes agrícolas e industriais (HARRIS et al., 2003).

### 3.1. Bactérias indicadoras de qualidade

As bactérias patogênicas são particularmente preocupantes nas frutas e hortaliças por possuírem a capacidade de se desenvolverem antes do consumo do produto fresco (NACMCF, 1999), com a ressalva de que em muitos casos não ocorrem alterações perceptíveis, mesmo em populações relativamente altas. Já a atividade de uma microbiota diversificada pode fornecer indicações de abuso de temperatura e idade do produto, por meio de deteriorações. Além disso, as bactérias patogênicas podem ser inibidas ou até mesmo eliminadas pela ação da microbiota competidora ou antagonista, que é naturalmente encontrada nas frutas e hortaliças (SCHUENZEL; HARRISON, 2002). Conseqüentemente, especificações requerendo uma contagem muito baixa de bactérias podem comprometer a segurança dos produtos frescos (HARRIS et al., 2003). Entretanto, alta carga microbiana indica condições inadequadas de obtenção, processamento ou acondicionamento das frutas e hortaliças.

Os grupos de coliformes totais e fecais e a detecção de *E. coli* são comumente utilizados para avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. Entretanto, a presença dos grupos de coliformes em frutas e hortaliças é considerada normal, uma vez que fazem parte da microbiota natural das plantas e não pode ser associada a uma contaminação fecal. Nesse caso, recomenda-se a utilização de *E. coli*, o indicador mais válido de contaminação fecal (KORNACKI; JOHNSON, 2001). Mas a sua presença, mesmo que em altas concentrações, não significa necessariamente que ocorreu contaminação fecal. *E. coli* pode se desenvolver em vários nichos ecológicos, incluindo o ambiente de processamento,

ou se tornar parte da microbiota residente da indústria, especialmente quando a higienização é inadequada (COX et al., 1988). Desse modo, uma das aplicações mais importantes dos grupos de coliformes e da análise de *E. coli* é na avaliação de programas de higienização das frutas e hortaliças, assim como das condições higiênicas dos ambientes de processamento (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

### 3.2. Vírus patogênicos

Os vírus não se desenvolvem nos alimentos, pois necessitam de células vivas específicas para se replicar. Entretanto, existem evidências indicando que esses microrganismos são resistentes a uma variedade de condições adversas, podendo permanecer no alimento por um período superior à sua vida útil e em quantidade suficiente para causar doenças (SEYMOUR; APPLETON, 2001).

Existem muitos grupos de vírus que poderiam contaminar as frutas e hortaliças, mas os principais vírus patogênicos que contaminam esses produtos são os que infectam via do trato gastrintestinal, como o vírus Norwalk e outros vírus gastroentéricos similares e o vírus da hepatite A (SEYMOUR; APPLETON, 2001). A presença desses vírus entéricos nos alimentos é atribuída em grande parte à contaminação fecal humana, uma vez que o organismo humano é a sua fonte definitiva de contaminação (ICMSF, 1996). Os vírus podem ser excretados em grande quantidade pelas fezes (até  $10^{11}$  partículas de rotavírus por grama de fezes) de indivíduos infectados por períodos que podem variar entre alguns dias a várias semanas, dependendo do vírus e estágio da infecção (KOOPMANS; DUIZER, 2004; ICMSF, 1996). Uma fonte importante desses perigos são as pessoas infectadas e que apresentam sintomas clínicos mínimos ou imperceptíveis (portadores assintomáticos). Sabe-se que o principal período de excreção do vírus da hepatite A é antes do aparecimento de sintomas clínicos (KOOPMANS; DUIZER, 2004; ICMSF, 1996).

### 3.3. Fungos micotoxigênicos

O desenvolvimento de determinados fungos filamentosos em alimentos, além de acelerar a sua deterioração, pode resultar na produção de micotoxinas. Essas toxinas podem permanecer no alimento mesmo na ausência de sinais visíveis de emboloramento (PITT, 2000). *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. são fungos micotoxicogênicos naturalmente encontrados no ambiente agrícola, possuindo a capacidade de se desenvolverem numa variedade de substratos e sob diversas condições de umidade e temperatura. A deterioração fúngica das frutas por esses microrganismos pode estar associada à produção de várias micotoxinas, particularmente aflatoxina, ocratoxina A e patulina (HASAN, 2000). Entretanto, a deterioração ocasionada por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* é considerada significativa somente após a infecção de uma plantação por organismos fitopatogênicos ou se ocorrer algum tipo de injúria física ou fisiológica na fruta ou hortaliça (ZIMMERLI; DICK, 1996).

A micotoxina mais relatada em suco de maçã é a patulina, ressaltando-se que a Organização Mundial de Saúde recomenda uma concentração máxima de 50 µg/L no produto. A patulina é produzida por aproximadamente 60 espécies de fungos que pertencem a mais de 30 gêneros (DRUSCH; RAGAB, 2003). Nas maçãs, as regiões deterioradas são as que apresentam as maiores concentrações de patulina. Essa toxina pode se difundir, a partir da área infectada do fruto, até uma profundidade de 2 cm. Conseqüentemente, a remoção dessa parte da maçã reduz significativamente o nível de patulina no produto. Entretanto, em outras frutas como o tomate, a patulina se difunde por todo o tecido interno. Essa diferença de difusão da patulina pelo interior dos alimentos aparentemente está ligada à “viscosidade” do tecido interno da fruta (RYCHLIK; SCHIEBERLE, 2001).

#### **4. PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE FRUTAS E HORTALIÇAS**

Uma etapa fundamental ao se elaborar uma estratégia para garantia da segurança das frutas e hortaliças é a investigação da natureza dos contaminantes na cadeia produtiva. Essa etapa deve ser priorizada em detrimento de análises do alimento, considerando-se que a distribuição dos microrganismos patogênicos nos alimentos é tipicamente desuniforme, a sua detecção é infreqüente e, quando presente, está geralmente em baixas concentrações (BRACKETT, 1999). Conseqüentemente, os estudos de incidência são caros e demorados, sendo as informações geradas limitadas a um produto de determinada região e durante um período do ano em particular (HARRIS et al., 2003). Além disso, a determinação do microrganismo patogênico de maior significância ou indicador de perigo no alimento apresenta-se como uma tarefa de alta complexidade.

A compreensão sobre os microrganismos patogênicos e suas interações ambientais é limitada, à medida que ocorre uma evolução microbiana que é natural e, às vezes, catalisada pela ação humana. A prevenção da contaminação fecal das frutas e hortaliças é geralmente priorizada à medida que as doenças veiculadas por esses produtos são transmitidas, principalmente, pela via feco-oral. Entretanto, deve-se ressaltar que nem todos os microrganismos patogênicos podem ser correlacionados com indicadores de contaminação fecal e existem microrganismos cuja fonte primária não é o ambiente entérico.

A contaminação de frutas e hortaliças pode ocorrer por qualquer material que entre em contato com a sua superfície. No ambiente agrícola, o solo, a água, os animais e os agricultores são particularmente importantes nessa contaminação das frutas e hortaliças (NACMCF, 1999). A fertilização do solo com esterco ou biossólidos municipais (esgoto) inadequadamente estabilizados é considerada umas das suas principais fontes de contaminação (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, 1998). A contaminação fecal do solo pode aumentar se não existirem instalações sanitárias adequadas nas proximidades das áreas de produção (FDA, 1998).

Existem várias fontes de poluição da água, sendo as mais comuns o despejo direto de biossólidos municipais no curso d'água e a lixiviação do solo contaminado. A importância da identificação e controle de fontes potenciais de contaminação da água é amplificada, considerando-se que a água utilizada na agricultura geralmente não é tratada. Além da qualidade da água, outros fatores, como o tipo de irrigação, podem influenciar a contaminação das frutas e hortaliças. As técnicas de irrigação, como a por pivô central, que expõe as plantas a um contato direto com a água, aumentam a probabilidade de contaminação destas (NACMCF, 1999).

Os animais silvestres ou domésticos e as pragas constituem outra fonte potencial de contaminação das frutas e hortaliças, seja no ambiente agrícola, seja após a colheita. Porém, enquanto os animais domésticos podem ser evitados nas áreas de produção e manipulação de alimentos, o controle de animais silvestres ou pragas é limitado (HARRIS et al., 2003).

A colheita é uma etapa crítica devido ao potencial de contaminação através do contato das mãos com as frutas e hortaliças. A extensão desse contato varia com o tipo de produto e com a tecnologia empregada na colheita e em algumas operações pós-colheita. As boas práticas de higiene pessoal são amplamente preconizadas e devem ser associadas à racionalização de técnicas de manipulação de alimentos, prevenindo o contato direto das mãos com as frutas e hortaliças (ICMSF, 1996). As luvas devem ser utilizadas em etapas específicas e por manipuladores treinados. Outras superfícies que entram em contato com as frutas e hortaliças no momento da colheita (equipamentos, utensílios, recipientes) e no seu transporte devem ser projetadas e construídas de modo a evitar deposições de sujidades e facilitar a sua higienização (SUSLOW et al., 2001).

A contaminação pode aumentar durante o processamento ou em nível doméstico, seja por manipuladores infectados, seja pelo contato com a água, superfícies de trabalho, embalagens ou outros ambientes contaminados. A higienização de frutas e hortaliças deve ser associada ao controle de contaminantes no ar, instalações, equipamentos e utensílios envolvidos nessa

operação e nas etapas subseqüentes do processamento. Como a higienização tipicamente não remove ou inativa completamente os microrganismos patogênicos presentes na matéria-prima, o processamento de um lote contaminado pode resultar na contaminação ambiental e das superfícies de processamento (VANETTI, 2004). Nesse ciclo de contaminações, a água, no estado líquido ou como gelo, pode ser contaminada ou servir de importante fonte de microrganismos patogênicos das frutas e hortaliças. A água é amplamente utilizada no processamento da maioria das frutas e hortaliças, e a contaminação desses produtos pode ocorrer tanto no enxágue quanto em outras operações, como refrigeração, transporte, higienização ou aplicação de ceras e fungicidas (IFT, 2000). Desse modo, a qualidade da matéria-prima, condição fundamental para a segurança do produto final, também implica prevenção de vários tipos de contaminações cruzadas.

## **5. HIGIENIZAÇÃO DE FRUTAS E HORTALIÇAS**

A higienização de frutas e hortaliças permite a remoção de sujidades visíveis e a redução de contaminantes oriundos da produção e processamento desses produtos. Essa operação auxilia a disponibilização de alimentos seguros e com qualidade especificada pelo comprador ou exigida pela legislação (ANDRADE et al., 2004). Conseqüentemente, a higienização não somente afeta os atributos de qualidade sanitários, sensoriais e nutricionais do alimento, como tem impacto sobre a reputação do fornecedor. Entretanto, alguns produtos, por exemplo morangos e framboesas, são muito delicados, não sendo tipicamente higienizados após a colheita.

A limpeza ou lavagem de frutas e hortaliças objetiva remover as sujidades visíveis da superfície destas, permitindo uma redução considerável da carga microbiana do produto. Essa operação pode consistir num simples enxágue com água clorada ou na combinação de outros tratamentos físicos e químicos, principalmente para os produtos mais resistentes. Nesse caso, a operação pode envolver a aplicação de água e detergente, bem como o tratamento mecânico da superfície dos produtos com escovas ou borrifo d'água, seguidos por um enxágue

com água. Entretanto, a lavagem mais drástica pode resultar em certa remoção das camadas de cutícula que envolve a superfície do produto, que serve como barreira microbiana. Ocasionalmente, a cera natural pode ser reposta por ceras comerciais (PARISH et al., 2003).

A sanitização pode complementar a limpeza no controle microbiano das frutas e hortaliças. As definições de sanitizante e sanitização contemplam a típica impossibilidade de remover ou eliminar todas as células vegetativas de microrganismos, sejam patogênicas, sejam de outra natureza. No teste de suspensão da Association of Official Agricultural Chemists – AOAC (1997), a definição de sanitizante está relacionada com o seu desempenho, ou seja, uma substância química capaz de reduzir 99,999% da contagem de determinada bactéria em 30 s e nas condições do teste. Este teste é indicado para determinação da concentração mínima de um sanitizante para superfícies não-porosas que contatam alimentos. No guia para minimização de riscos microbianos em produtos hortifrutícolas frescos do FDA (1998), a sanitização de produtos frescos é definida como: “tratar produtos hortifrutícolas através de um processo que é eficaz para destruir ou reduzir substancialmente o número de microrganismos preocupantes para a saúde pública, assim como outros microrganismos indesejáveis, sem afetar adversamente a qualidade do produto ou a segurança do consumidor”.

Atualmente não existe tratamento que virtualmente elimine todos os microrganismos patogênicos de frutas e hortaliças sem ocasionar alterações sensoriais indesejáveis no produto ou em sua superfície. A limitação da sanitização química da superfície das frutas e hortaliças pode ser atribuída às irregularidades superficiais, à adesão microbiana, à localização dos microrganismos em estruturas protetoras (BURNETT; BEUCHAT, 2000) e à molhagem incompleta da superfície do produto (BRACKETT, 1987). Nos produtos minimamente processados ou nos frutos destinados à produção de sucos, em que ocorre a remoção do pericarpo da fruta ou casca da hortaliça, podem-se aplicar tratamentos mais severos, a exemplo de água aquecida, vapor d'água ou flambagem (chama), sem alterações sensoriais indesejáveis do produto.

A higienização pode aumentar a contaminação das frutas e hortaliças se não for realizada de forma adequada. Isso pode ocorrer pela contaminação cruzada pela água e pela internalização microbiana. Essa internalização tem a possibilidade de ocorrer pela imersão de uma fruta ou hortaliça em uma solução em temperatura inferior à do produto. Quando um produto é imerso em solução numa temperatura relativa mais baixa, o ar dentro da estrutura vegetal reduz a sua pressão interna, permitindo que o efeito combinado da pressão atmosférica e da pressão hidrostática force a solução externa a se internalizar pelos poros do vegetal, possibilitando a contaminação do produto (BURNETT; BEUCHAT, 2000).

A eficiência da higienização das frutas e hortaliças pode ser aumentada por uma pré-limpeza a seco de sujidades grosseiras, associada a uma seleção e descarte de produtos injuriados ou deteriorados. Em seguida à higienização, pode ser realizada uma drenagem dos produtos, permitindo uma remoção da água superficial e fluidos vegetais de células injuriadas (SIMONS; SANGUANSRI, 1997).

### **5.1. Sanitizantes químicos**

Os sanitizantes químicos, em particular os compostos clorados, têm sido amplamente empregados na indústria de alimentos, possibilitando o controle microbiano de ambientes de processamento, da água e dos alimentos. Apesar de o cloro e outros sanitizantes reduzirem a população microbiana das células expostas na superfície do produto em 2 ou 3 ciclos logarítmicos, pouco se sabe a respeito da eficácia dos desinfetantes na destruição de células localizadas em locais protegidos da epiderme e no interior do vegetal (BURNETT; BEUCHAT, 2000). A imersão de frutas e hortaliças em água pode reduzir o número de células recuperadas de sua superfície entre 1 e 2 ciclos logarítmicos (BEUCHAT, 1998). Isso indica que parte considerável da redução causada pelos tratamentos químicos é ocasionada pela remoção física ou desprendimento das células pelo enxágue. Assim, os sanitizantes têm como função primária manter a qualidade microbiológica da água (BRACKETT, 1999).

Historicamente, os hipocloritos têm se destacado devido ao seu custo reduzido e efetividade na inativação de microrganismos em solução e em superfícies não-porosas de contato com alimentos (WEI et al., 1985; ELPHICK, 1998). Na otimização da sanitização das frutas e hortaliças, as reações químicas dos hipocloritos na água têm que ser examinadas. Quando os hipocloritos são adicionados à água, eles são encontrados em duas formas de cloro livre: o íon hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) e o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). O ácido hipocloroso é a forma de cloro, derivada dos hipocloritos, que tem a maior atividade antimicrobiana. O equilíbrio entre  $\text{HOCl}$  e  $\text{OCl}^-$  é dependente do pH, sendo a concentração de  $\text{HOCl}$  aumentada pela diminuição do pH e vice-versa. A estabilidade da solução aquosa de hipoclorito, assim como o efeito antimicrobiano do cloro livre, é afetada por outros fatores, incluindo concentração de hipoclorito, temperatura, presença de matéria orgânica, radiação luminosa, ar e certos metais (PARISH et al., 2003; DYCHDALA, 1991).

A sanitização de frutas e hortaliças é tipicamente realizada com concentrações de cloro total variando entre 50 e 200 mg/L e em diferentes valores de pH (FDA, 1998). Quando o pH da solução sanitizante não é ajustado, o tempo de contato do sanitizante com o produto é de 5 a 30 min. No pH alcalino, o cloro é mais estável, sendo o ácido hipocloroso, que é consumido na atividade antimicrobiana, repostado pelo equilíbrio com o íon hipoclorito (DYCHDALA, 1991). Já nos sistemas de higienização comerciais o tempo de contato é mais curto, cerca de 1 a 2 min (FDA, 1998). Nesse caso, o pH da solução deve ser controlado, de modo que a concentração do ácido hipocloroso seja aumentada (ELPHICK, 1998; FDA, 1998). Tipicamente, valores de pH entre 6,5 e 7,5 são eficientes, enquanto minimizam a corrosão em equipamentos (PARISH et al., 2003).

Existem poucas desvantagens que vêm progressivamente limitando o uso do cloro na indústria de alimentos. O cloro, como todo agente oxidante, pode reagir com vários compostos orgânicos, sendo difícil prever os produtos dessa reação. Nas frutas e hortaliças, a oxidação dos componentes orgânicos pode ser prevenida pela barreira protetora da epiderme, pela compartimentalização de seus

componentes e pela sua composição, que geralmente tem baixos níveis de lipídios.

As organizações ambientais e de saúde pública têm expressado a sua preocupação quanto à formação de compostos organoclorados, como os tri-halometanos e outros resíduos químicos, no retorno dos efluentes industriais para o ambiente. O cloro pode reagir com substâncias orgânicas (ácidos húmicos e fúlvicos) naturalmente presentes na água, dando origem a vários compostos com atividade potencialmente mutagênica e, ou, carcinogênica (RICHARDSON, 2003).

Na tentativa de controlar os perigos microbianos e os níveis de tri-halometanos na água, algumas medidas são propostas, dentre as quais o pré-tratamento da água para reduzir os níveis de matéria orgânica, a remoção dos tri-halometanos após o tratamento da água e a utilização de tratamentos que não gerem compostos tóxicos (BRODTMAN; RUSSO, 1979 apud KIM et al., 1999). Mas muitas unidades de tratamento de água vêm substituindo o cloro por outros desinfetantes, como o dióxido de cloro, o ozônio e o ácido peracético. Esses tratamentos geralmente reduzem os níveis de tri-halometanos na água, mas podem aumentar o nível de outros compostos potencialmente tóxicos (RICHARDSON, 2003; MONARCA et al., 2000).

O dióxido de cloro e o ozônio são agentes mais oxidantes que os hipocloritos, o que geralmente potencializa e amplia o seu espectro antimicrobiano, tornando-os efetivos em baixas concentrações e tempo de contato reduzido (XU, 1999; WEI et al., 1985). No entanto, a reatividade do dióxido de cloro e do ozônio aumenta a sua instabilidade e os custos do sistema, uma vez que são degradados rapidamente e devem ser gerados no local de aplicação. Assim como os hipocloritos, o dióxido de cloro e o ozônio têm a sua efetividade influenciada por fatores como o pH da solução, a temperatura e a matéria orgânica envolvendo os microrganismos (KIM et al., 1999). Além disso, o dióxido de cloro e o ozônio são corrosivos e perigosos, devendo seguir uma série de medidas de segurança para prevenção de exposições perigosas ou desnecessárias. Deve-se

considerar também que a oxidação das frutas e hortaliças pode resultar em alterações sensoriais e nutricionais indesejáveis (PARISH et al., 2003).

Os ácidos orgânicos são uma alternativa de sanitizantes que não resulta na formação de substâncias tóxicas e que minimiza o impacto ambiental. A sanitização de frutas e hortaliças nas condições domésticas é viabilizada pela utilização de ácido cítrico, na forma do suco de limão, e ácido acético, na forma de vinagre. Na indústria de alimentos, os ácidos orgânicos são empregados principalmente como acidulantes e conservantes. Na sanitização de alimentos, a utilização de ácido láctico é relatada em carcaças animais, com a ressalva de que existem várias pesquisas demonstrando a eficácia na descontaminação de frutas e hortaliças por ácidos orgânicos (PARISH et al., 2003). A potencialização e ampliação do espectro antimicrobiano dos ácidos orgânicos pode ser realizada pela sua combinação com hipocloritos (ZHANG; FARBER, 1996) ou com outros sanitizantes, como no caso do ácido peracético, e da combinação do ácido acético com o peróxido de hidrogênio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, F. X.; PINTO, R. M.; BOSCH, A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3704-3710, 1994.
- AMANATIDOU, A.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M. Effect of elevated oxygen and carbon dioxide on the surface growth of vegetable-associated micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 429-38, 1999.
- ANDRADE, N. J.; ANTUNES, M. A.; BASTOS, M. S. R. Higiene na indústria de alimentos minimamente processados. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, 3, 2004, Viçosa. **Resumos**. p.40-47.
- ARCHER, D. L. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 3, p. 91-95, 1996.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official Methods of Analises. Ed. 16, Rev 3. Gaithersburg, MD, 1997. Method 6.3.03.
- BEUCHAT, L. R. **Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review**. World Health Organization, Food Safety Unit, 1998. (WHO/FSF/FOS/98.2). Disponível em: <[www.who.int/fsf/fos982~1.pdf](http://www.who.int/fsf/fos982~1.pdf)>. Acesso em: 16 jun. 2004.
- BRACKETT, R. E. Antimicrobial Effect of Chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n.12, p. 999-1003, 1987.
- BRACKETT, R. E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biology and Technology**, v.15, n.3, p. 305-311, 1999.
- BRACKETT, R. E.; SPLITTSTOESSER, D. F. Fruits and vegetables. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the**

**Microbiological Examination of Foods.** 4 ed. Washinton, D.C., 2001. p. 215-520.

BURNETT, S. L.; BEUCHAT L. R. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 281-287, 2000.

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST. **Outbreak alert!**: closing the gaps in our federal food-safety net. Washington, D.C, 2004. Disponível em: <[www.cspinet.org/new/pdf/outbreakalert2004.pdf](http://www.cspinet.org/new/pdf/outbreakalert2004.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2004.

COX, L. J.; KELLER, N.; SCHOTHORST M. The use and misuse of quantitative determinations of *Enterobacteriaceae* in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, Supplement, v. 65, p. 237S-250S, 1988.

DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 8, p. 1514-1527, 2003.

DYCHDALA, G. R. Chlorine and chlorine compounds. In: BLOCK S. S. **Disinfection, Sterilization, and Preservation.** 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 131-151.

ELPHICK, A. Fruit and vegetable washing systems. **Food Processing**, p. 22-23, January, 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guia para minimização de riscos microbianos em produtos hortifrutícolas frescos.** Washington, D.C., 1998. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/pprodgui.html>>. Acesso em: 23 set. 2004.

FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 16, p. 5129-5135, 1991.

FRANK, J. F. Microbial attachment to food and food contact surfaces. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 43, p. 320-380, 2001.

GOODSON, M.; ROWBURY, R. J. Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sublethal acid pH value. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 77-79, 1989.

HARRIS, L. J.; FARBER, J. N.; BEUCHAT, L. R.; PARISH, M. E.; SUSLOW, T. V.; GARRET, E. H.; BUSTA, F. F. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce**. Chicago, 2003. v. 2. Disponível em: <<http://www.ift.org/cms/?pid=1000384>>. Acesso em: 16 fev. 2004.

HASAN, H. A. H. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 607-612, 2000.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Emerging microbiological food safety issues**: Implications for control in the 21<sup>st</sup> century. Chicago, 2000. Disponível em: <<http://www.ift.org/cms/?pid=1000377>>. Acesso em: 15 jun. 2004.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods 5**: characteristics of microbial pathogens. Londres: Blackie Academic & Professional, 1996. 513 p.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 23- 41, 2004.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington, D.C., 2001. p. 69-82.

KROLL, R. G.; PATCHETT, R. A. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 224-227, 1992.

LUND, B. M. Ecosystems in vegetable foods. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement, v. 73, n. 21, p. 115S-126S, 1992.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; COLLIVIGNARELLI, C.; GUZZELLA, L.; ZERBINI, I.; BERTANZA, G.; PEDRAZZANI, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4261-4269, 2000.

MORETTI, C. L. Panorama do processamento mínimo de hortaliças. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, 3, 2004, Viçosa. **Resumos**. p.1-8.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Microbiological safety evaluation and recommendations on fresh produce. **Food Control**, v. 10, n. 2, p. 117-143, 1999.

NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 371-401, 1994.

PARISH, M. E. Public health and nonpasteurized fruit juices. **Critical review in microbiology**, v. 23, n. 2, p. 109-119, 1997.

PARISH, M. E.; BEUCHAT, L. R.; SUSLOW, T. V.; HARRIS, L. J.; GARRETT, E. H.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. **Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce** In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Chicago, 2003. v. 2. Disponível em: <<http://www.ift.org/cms/?pid=1000384>>. Acesso em: 16 fev. 2004.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 184-92, 2000.

RICHARDSON, S. D. Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 666-684, 2003.

RYCHLIK, M.; SCHIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 3, p. 274-278, 2001.

SCHUENZEL, K. M.; HARRISON, M. A. Microbial Antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 12, p. 1909-1915, 2002.

SEYMOUR, I.J.; APPLETON, H. Foodborne viruses and fresh produce. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 759-773, 2001.

SIMONS, L. K.; SANGUANSRI, P. Advances in washing of minimally processed vegetables. **Food Australia**, v. 49, n. 2, p. 75-80, 1997.

SPURR, H. W. J. The microbial ecology of fruit and vegetable surface: Its relationship to postharvest biocontrol. In: WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. **Biological Control of Postharvest Diseases: theory and practice**. CRC Press: Boca Raton, 1994. p. 11-23.

SUSLOW, T. V.; ORIA, M. P.; BEUCHAT, L. R.; GARRETT, E. H.; PARISH, M. E.; HARRIS, L. J.; FARBER, J. N.; BUSTA, F. F. **Production practices as risk factors in microbial food safety of fresh and fresh-cut produce**. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. *Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce*. Chicago, 2003. v. 2. Disponível em: <<http://www.ift.org/cms/?pid=1000384>>. Acesso em: 16 fev. 2004.

VANETTI, M. C. D. Segurança microbiológica em produtos minimamente processados. In: Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, 3, 2004, Viçosa. **Resumos**. p.30-32.

WEI, C. -I.; COOK, D. L.; KIRK, J. R. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technology**, p. 107-115, January, 1985.

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, n. 8, p. 867-872, 1997.

XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruit and vegetables. **Food Technology**, v. 53, n. 10, p. 58-61, 63, 1999.

ZHANG, S.; FARBER, J. M. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, v. 13, n. 13, p. 311-321, 1996.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 6, p. 655-668, 1996.

## **CAPÍTULO II**

### **Descontaminação da Superfície do Coco Verde por Métodos Físicos e Químicos**



## Descontaminação da Superfície do Coco Verde por Métodos Físicos e Químicos

Eduardo H. M. Walter, Arnaldo Y. Kuaye

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver a flambagem como tratamento de descontaminação da superfície do coco verde, bem como avaliar a eficácia dos tratamentos com hipoclorito de sódio, ácido peracético e vapor superaquecido. *Listeria monocytogenes* foi utilizado como microrganismo-teste. Uma área retangular, de 3,0 x 2,0 cm, na superfície lateral de cocos verdes foi demarcada e inoculada pontualmente com uma mistura de 5 cepas de *L. monocytogenes*, sendo os frutos incubados por 24 h em estufas a 35,5 e 37 °C. Os tratamentos químicos, que consistiram na imersão dos frutos em água destilada estéril, solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L e pH 6,5) e solução de ácido peracético (80 mg/L) por 2 min, reduziram a população inicial de *L. monocytogenes* em 1,55; 3,84; e 4,47 log UFC/superfície-teste do fruto, respectivamente, e diferiram significativamente ( $\alpha=0,05$ ) entre si. No tratamento com vapor superaquecido, a superfície-teste foi exposta ao vapor direto por 7 s e, na flambagem à chama direta, por 3 s. Ambos os tratamentos físicos reduziram mais de 5,69 log UFC de *L. monocytogenes*/superfície-teste do fruto. Os caldos de enriquecimento de amostras submetidas ao vapor superaquecido turvaram após 24 h de incubação a 35 °C. Nenhum microrganismo foi detectado dos caldos de enriquecimento provenientes das amostras submetidas à flambagem, e incubados por 48 h. Assim, a flambagem foi considerada o tratamento mais eficaz na descontaminação da superfície do coco verde.

## 1. INTRODUÇÃO

A água de coco é uma bebida refrescante muito apreciada nos países tropicais, principalmente nas regiões litorâneas, onde o coqueiro faz parte da paisagem. No mercado internacional, a água de coco conta com um apelo natural e alegadas propriedades funcionais (HOLLINGSWORTH, 2000). Tradicionalmente, a água de coco é consumida diretamente do coco verde, mas, devido a dificuldades no transporte e abertura do fruto, a bebida é convenientemente envasada. O processamento industrial da água de coco virtualmente elimina todos os microrganismos que possam causar algum tipo de doença humana. Entretanto, as características sensoriais da água de coco *in natura* ou envasada a fresco são consideradas superiores às da bebida pasteurizada ou comercialmente estéril (ARAÚJO et al., 2000; FRASSETTI et al., 2000).

A contaminação da água de coco, tipicamente, inicia-se durante a sua extração, pelo contato com a superfície do coco verde e com os equipamentos. A composição química da bebida, com altos teores de açúcares e sais minerais (JAYALEKSHMY et al., 1986), pode propiciar condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano, principalmente das bactérias. *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* foram encontrados em populações de até  $1,6 \times 10^5$  UFC/mL (LEITE et al., 1998) e  $8,0 \times 10^4$  UFC/mL (HOFFMANN et al., 2002) em água de coco comercializada sob refrigeração, respectivamente. Já Melo e outros (2003) detectaram *Escherichia coli* e *Salmonella* na bebida não-pasteurizada.

A segurança da água de coco fresca depende fundamentalmente da prevenção de sua contaminação, associada a uma adequada refrigeração durante o transporte e armazenamento. Na água de coco armazenada sob refrigeração, *Listeria monocytogenes* pode se desenvolver e chegar a populações de até  $10^7$  UFC/mL (WALTER et al., 2005). Esse microrganismo apresenta o potencial de contaminar a superfície do coco verde devido à sua ampla distribuição no ambiente agrícola (RENTERGHEM et al., 1989). Apesar da sensibilidade dos microrganismos patogênicos ao cloro ser variável, *L. monocytogenes* geralmente é

mais resistente a esse sanitizante do que *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 (BURNETT; BEUCHAT, 2000). As recomendações de processamentos térmicos que são baseadas nesses microrganismos patogênicos entéricos podem não ser suficientes para eliminar uma população similar de *L. monocytogenes* (DOYLE et al., 2001).

Os compostos clorados, em particular os hipocloritos, são amplamente utilizados no controle microbiano, tendo uma longa história de uso na indústria de alimentos (WEI et al., 1985). Os hipocloritos apresentam vantagens econômicas e são eficientes na inativação de microrganismos em suspensão na água e em superfícies não-porosas de contato com alimentos (BRACKETT, 1987). Entretanto, a eficácia dos hipocloritos na superfície de frutas e hortaliças é limitada (BURNETT; BEUCHAT, 2000). Além disso, os hipocloritos apresentam a possibilidade de formarem compostos potencialmente tóxicos nos alimentos e contaminam o meio ambiente, através dos efluentes industriais (WEI et al., 1985).

A descontaminação da superfície do coco verde pode ser realizada por tratamentos mais severos, devido ao seu pericarpo espesso e resistente, que é descartado na produção da água de coco. O tratamento térmico vem sendo empregado no controle microbiano e na desinfestação de uma variedade de frutas e hortaliças, pelo menos, desde o início do século XX (LURIE, 1998). Mas, quando o dibrometo de etileno e o brometo de metila passaram a ser utilizados como fumigantes, o uso do calor no tratamento pós-colheita foi praticamente abandonado, ressurgindo com a proibição ou restrição das substâncias químicas. Na indústria de alimentos, o branqueamento (70-105 °C) é associado à destruição da atividade enzimática, assim como a pasteurização (60-85 °C) é associada à destruição de microrganismos patogênicos na forma vegetativa (WILLIAMS et al., 1986).

O objetivo deste estudo foi desenvolver a flambagem como tratamento prático e efetivo na descontaminação da superfície do coco verde, bem como avaliar a eficácia dos tratamentos com hipoclorito de sódio, ácido peracético e vapor superaquecido, utilizando-se *L. monocytogenes* como microrganismo-teste.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cocos verdes

Os ensaios experimentais foram conduzidos em cocos verdes (*Cocos nucifera* L.) da variedade Anã, provenientes do Estado do Espírito Santo e adquiridos na Central de Abastecimento de Campinas. Os cocos verdes (54 frutos), com cerca de sete meses de maturação, foram visualmente selecionados nos cachos, escolhendo-se aqueles com poucas lesões mecânicas. Esses frutos foram mantidos à temperatura ambiente por até 3 dias, quando, então, procedeu-se aos ensaios experimentais.

### 2.2. Preparo dos frutos

Inicialmente, os cocos verdes foram lavados com água potável de abastecimento público, sendo esfregados com uma espuma de poliuretano (Scotch-Brite, 3M do Brasil Ltda.). Em seguida, os frutos foram drenados e transferidos individualmente para recipientes plásticos, de modo que um dos seus lados ficasse voltado para cima e na posição horizontal. Utilizando-se um marcador e um bisturi estéril, foi demarcada uma área de 3,0 x 2,0 cm, numa superfície do fruto relativamente plana e sem injúrias mecânicas. Essa área consistiu a superfície-teste para a determinação da população de *L. monocytogenes* inicial e após os tratamentos, sendo demarcada 15 min antes da inoculação.

### 2.3. Microrganismos-teste

O inóculo foi composto por uma mistura de 5 cepas de *L. monocytogenes* (IOC 1898, sorovar 1/2a, isolado de espinafre; ATCC 19115, sorovar 4b, isolamento humano; IOC 1551, sorovar 1/2a, isolado de bacon; IOC 1324, sorovar 1/2b, isolado de embutido fresco; IOC 1527, sorovar 1/2a, isolado de carne cozida congelada). A primeira cepa foi obtida da coleção de culturas da Universidade de São Paulo e as demais cepas, da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). As

cepas de *L. monocytogenes* tiveram a sua identificação confirmada por meio de testes bioquímicos (PAGOTTO et al., 2001) e foram examinadas por seu antagonismo mútuo (BEUCHAT et al., 2001c). As culturas foram mantidas a 4 °C em ágar tripticase de soja (Difco) suplementado com extrato de levedura (Biobrás).

#### **2.4. Preparo do inóculo**

As 5 cepas de *L. monocytogenes* foram cultivadas independentemente em 10 mL de caldo tripticase de soja (TSB, Difco) suplementado com extrato de levedura (YE, Biobrás), com incubação a 35 °C por 24 h. Alíquotas das culturas foram transferidas mais duas vezes para TSB-YE, com a mesma alça de inoculação, e em intervalos sucessivos de 24 h. As culturas foram centrifugadas (2.000 x *g* por 15 min, à temperatura ambiente), sendo o sobrenadante descartado, e o sedimentado, lavado com 10 mL de água peptonada 0,1%. As massas celulares foram coletadas após uma nova centrifugação e ressuspensas em 5 mL de água peptonada 0,1%. O inóculo, aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL, foi formado pela combinação de volumes iguais das 5 suspensões.

Após homogeneização, a suspensão do inóculo foi dividida em 5 alíquotas. Uma delas foi mantida à temperatura ambiente, sendo utilizada para a inoculação dos 4 primeiros frutos, num período de 45 min. As outras 4 alíquotas foram refrigeradas a 4 °C, sendo retiradas do refrigerador 15 min antes de sua utilização nas inoculações subseqüentes. Esse procedimento permitiu a inoculação de 18 cocos verdes com a mesma concentração de células.

#### **2.5. Procedimento de inoculação e secagem**

A inoculação foi realizada com o auxílio de uma micropipeta, pela aplicação de 100 µL da suspensão do inóculo, na forma de 20 gotículas, distribuídas na superfície-teste (área demarca na superfície do fruto com 3,0 x 2,0 cm) de 18 cocos verdes. Os primeiros 12 frutos foram inoculados em intervalos sucessivos de 15 min numa câmara biossegura, do tipo fluxo laminar. Após 90 min do término

da décima segunda inoculação foram inoculados mais 3 frutos, em intervalos sucessivos de 5 min. Os últimos 3 frutos também foram inoculados em intervalos sucessivos de 5 min, decorridos 30 min do término da décima quinta inoculação. Imediatamente após cada inoculação, o coco verde era transferido para uma das estufas de secagem.

A secagem das gotículas do inóculo nos 18 cocos verdes foi realizada por um período de 24 h em duas estufas (Fanen Ltda., modelo 002 CB) providas de duas prateleiras cada. A temperatura média na primeira estufa era de 35,5 °C, sendo colocados 4 frutos em cada prateleira. Na segunda estufa, a temperatura média era de 37 °C, sendo colocados 4 e 6 frutos na prateleira inferior e superior, respectivamente. Os cocos verdes de cada prateleira foram considerados agrupamentos experimentais, pois se verificou que o tempo de secagem das gotículas de inóculo variava entre 2 e 7 h, de acordo com a prateleira e a estufa empregada. Os resultados obtidos em experimentos preliminares indicaram que a secagem em estufa, no lugar do fluxo laminar, e o agrupamento dos frutos em prateleiras possibilitaram uma uniformidade e consistência no tempo de secagem e na quantificação de células de *L. monocytogenes* recuperadas da superfície-teste.

## 2.6. Preparo dos tratamentos

A solução clorada foi preparada pela adição de hipoclorito de sódio (Super Cândida, Indústria Anhembí S.A.) a 1,8 L de solução-tampão de fosfato de potássio 0,01 M estéril, obtendo-se uma solução com 200 mg/L de cloro residual e pH 6,5. A solução de ácido peracético com 80 mg/L foi preparada pela adição de Tsunami 100 (Ecolab) a 1,8 L de água destilada estéril. A solução clorada foi analisada de acordo com a metodologia da American Public Health Association – APHA (1992) e de ácido peracético conforme a indicação do fabricante. Os volumes de hipoclorito de sódio e Tsunami 100 necessários para o preparo das soluções teste foram determinados 2 dias antes dos ensaios experimentais. As soluções-teste foram preparadas em frascos com tampa e barreira a luz, 30 min

antes dos tratamentos experimentais, sendo transferidas para o recipiente de imersão dos frutos 1 min antes da realização dos tratamentos experimentais.

O vapor superaquecido foi gerado por uma caldeira elétrica (Scott Engineering Sciences; Pompano Beach, Florida, EUA) com pressão manométrica de 0,8 kgf/cm<sup>2</sup> e temperatura interna de 124 °C. O diâmetro da mangueira de saída de vapor era de 12 mm.

A flambagem foi realizada num queimador de barra com pré-mistura (Biomatic, 1154), tipo Bünsen com múltiplos furos, com uma área do injetor de gás de 16,5 mm<sup>2</sup>. O combustível utilizado foi o gás liquefeito de petróleo (Agip do Brasil), apresentando pressão manométrica de 0,4 kgf/cm<sup>2</sup> e vazão de 74 L/h. O número de Wobbe foi de 15.271 kcal/Nm<sup>3</sup> (SANCHEZ, 2002) e a relação de ar primário na combustão, de 39,5.

Tanto o tratamento do coco verde com vapor superaquecido quanto com chama foi realizado a uma distância de 1,7 cm da saída da mangueira de vapor e do queimador, respectivamente. A temperatura do vapor e da chama foi medida por um termopar tipo K, posicionado paralelamente às proximidades da superfície do fruto, apresentando um valor de 117 e 1.150 °C, respectivamente. Quando o termopar foi inserido através do pericarpo e perpendicularmente à superfície do fruto, ficando somente com a sua ponta exposta ao vapor e à chama, estas temperaturas foram de 104 e 920 °C, respectivamente.

A temperatura da superfície do coco verde durante o tratamento com vapor superaquecido e de flambagem ficou entre os valores obtidos nas duas posições em que o termopar foi posicionado. Quando o termopar foi posicionado paralelamente às proximidades da superfície do fruto, a temperatura foi superior à sua temperatura superficial. No tratamento com vapor superaquecido, isso ocorreu devido ao efeito da camada-limite e, no tratamento com chama, em decorrência da maior radiação transferida ao termopar em relação à superfície do coco. Quando o termopar foi inserido no coco verde, a temperatura mensurada era inferior à sua temperatura superficial. Em ambos os tratamentos físicos a temperatura

mensurada, foi a de equilíbrio entre a temperatura interna, do pericarpo do fruto, e a temperatura externa, da chama ou do vapor.

## **2.7. Execução dos tratamentos**

Os tratamentos químicos foram realizados pela imersão dos cocos verdes por 2 min e à temperatura ambiente (25-30 °C) em água destilada estéril, em solução de hipoclorito de sódio 200 mg/L de cloro residual, com pH 6,5, e em solução de ácido peracético 80 mg/L. Os frutos foram posicionados de modo a assegurar a completa imersão da superfície-teste. Um coco verde dentre os 4 frutos de cada uma das prateleiras da estufa a 35,5 °C e da prateleira inferior da estufa a 37 °C foi submetido à análise da população inicial na superfície-teste (frutos sem tratamento) ou a um dos 3 tratamentos químicos. Os frutos foram retirados das estufas na seqüência em que tinham sido inoculados e em intervalos sucessivos de 15 min, sendo destinados para análise da população inicial ou para os tratamentos químicos de forma aleatória. Esses ensaios experimentais foram realizados em triplicata, sendo em cada repetição 3 frutos eram submetidos à análise da população inicial e 3 destinados a cada um dos tratamentos químicos.

No tratamento de flambagem, a superfície-teste foi exposta à chama direta por um período de 3 s e, no tratamento com vapor superaquecido ao vapor direto, por 7 s. No tratamento de flambagem e com vapor superaquecido, o coco verde foi posicionado de modo que a superfície-teste ficasse numa posição central e a uma distância de cerca de 1,7 cm do queimador e da mangueira de vapor, respectivamente. Os 3 primeiros cocos verdes colocados para secar o inóculo na prateleira superior da estufa a 37 °C foram submetidos ao tratamento de flambagem e os últimos 3 frutos, ao tratamento com vapor superaquecido, em intervalos sucessivos de 5 min, respectivamente. O tratamento de flambagem iniciou-se depois de 90 min do término dos 12 primeiros ensaios, enquanto o tratamento com vapor superaquecido, teve início passados 30 min do tratamento de flambagem, em que cada tratamento físico atendia 3 frutos. Os tratamentos físicos foram realizados em triplicata, sendo em cada repetição avaliados 3 cocos verdes.

## 2.8. Preparo das amostras para análise

Na análise da população inicial e após os tratamentos químicos e físicos, a superfície-teste foi removida com o auxílio de uma faca e de uma pinça estéril, sendo transferida para um saco de “stomacher” contendo 5 mL de solução de recuperação. A solução de recuperação era composta por água peptonada 0,1%, sendo nos tratamentos com hipoclorito de sódio e ácido peracético preparada uma solução com neutralizante, tiosulfato de sódio 0,05 M. A recuperação das células foi realizada pela esfregação vigoroso da superfície-teste, pela parte externa do saco de “stomacher”, com os dedos e por um período de 1 min. Essa esfregação foi realizada de forma circular e nos sentidos longitudinal, transversal e diagonal. O preparo da amostra para análise foi concluído pela agitação manual do saco contendo a superfície-teste por 30 s. O número de *L. monocytogenes* nas amostras representa a população na superfície-teste. Os resultados dos experimentos preliminares indicaram que a esfregação manual permitiu maior recuperação de células do que a agitação em “Stomacher 400” pelo mesmo período de tempo.

## 2.9. Análises microbiológicas

A população de *L. monocytogenes* no inóculo e nas 5 suspensões individuais de *L. monocytogenes* foi determinada pela diluição seriada (1:10) em água peptonada 0,1%, seguida pela inoculação de alíquotas de 0,1 mL (em duplicata) das diluições em superfície de ágar tripticase de soja (TSA, Difco) suplementado com extrato de levedura (YE, Biobrás) e meio Oxford (OXA, Oxoid), com incubação a 35 °C por 48 h.

Nas amostras provenientes da esfregação manual da superfície-teste, alíquotas sem diluição (0,1 mL em duplicata e 0,25 mL em quadruplicata) e de diluições seriadas em água peptonada 0,1% (0,1 mL em duplicata) foram inoculadas em TSA-YE e OXA e incubadas a 35 °C por 48 h. As colônias presuntivas foram enumeradas de acordo com a metodologia preconizada pela APHA (2001).

Aos sacos de “stomacher” contendo a superfície-teste do coco verde e a solução de recuperação, provenientes dos tratamentos físicos, foram adicionados 36 mL de caldo tripticase de soja (Difco) suplementado com extrato de levedura (Biobrás). Esse caldo de enriquecimento foi incubado nas mesmas condições das placas, sendo uma alíquota estriada em TSA-YE e em OXA, após 24 e 48 h de incubação.

### **2.10. Investigação de substâncias inibidoras no fluído vegetal**

A existência de substâncias inibidoras, as cepas de *L. monocytogenes*, no fluído vegetal oriundo da esfregação da superfície-teste do coco verde na solução de recuperação descrita anteriormente foi analisada de acordo com a metodologia da APHA (1992) para determinação de substâncias tóxicas na água.

### **2.11. Análise estatística**

Os dados experimentais referentes às quantificações de *L. monocytogenes* inicial e após os tratamentos foram convertidos em base logarítmica e submetidos à análise de variância, para verificar se os meios de cultura, as condições de secagem e os tratamentos eram estatisticamente diferentes. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, sendo a diferença mínima estabelecida no nível de 5% de significância. Os cálculos foram realizados através do programa Statistical Analysis System, versão 6.11 (SAS Institute).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado considerando-se a descontaminação de uma área da superfície do coco verde sem injúrias mecânicas e previamente lavada. A localização de microrganismos em estruturas protetoras na epiderme ou em sujidades superficiais limita consideravelmente a eficácia dos tratamentos de descontaminação. Essa situação é agravada pela rugosidade da superfície, como no cálice do coco verde, e pelo rompimento da epiderme vegetal, que expõe a superfície vegetal interna, libera fluidos celulares e transfere microrganismos para o vegetal (HARRIS et al., 2001). Além disso, deve-se considerar que a água utilizada no preparo das soluções-teste era destilada e estéril.

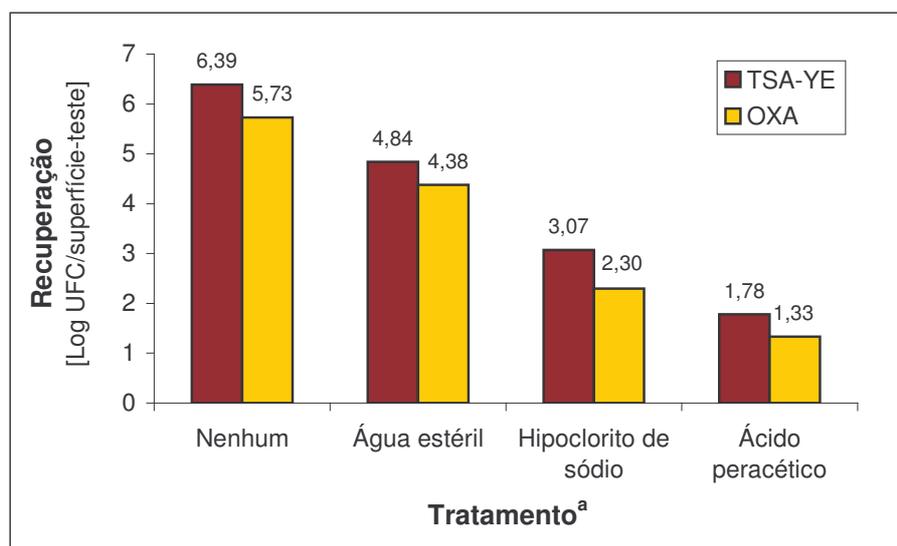
O teste de inibição cruzada indicou que as cepas de *L. monocytogenes* não apresentavam antagonismo mútuo, observando-se desenvolvimento compatível em TSA-YE.

O fluido vegetal liberado durante a esfregação da superfície-teste do coco verde na solução de recuperação não apresentou efeito inibitório ou letal sobre o inóculo de *L. monocytogenes*.

As populações nas 5 suspensões de *L. monocytogenes* utilizadas para a formação do inóculo variaram entre 9,84 e 9,13 log UFC/mL. A inoculação de uma alta população de *L. monocytogenes* na superfície do coco verde permitiu a quantificação das reduções ocasionadas pelos tratamentos químicos. Entretanto, Beuchat e outros (2004) observaram que, quanto maior a população de *L. monocytogenes* inoculado em alface, maior a redução causada pelos tratamentos com água, hipoclorito de sódio e ácido peracético.

A população de *L. monocytogenes* inoculada (suspensão com 100 µL) na superfície do coco verde foi de 8,62 e 8,54 log UFC, sendo calculada pelo plaqueamento do inóculo em TSA-YE e OXA, respectivamente. Após a secagem do inóculo na superfície-teste foi recuperada uma população de *L. monocytogenes* de 6,39 e 5,73 log UFC em TSA-YE e OXA, respectivamente. A diferença entre a concentração de células inoculadas e o de recuperadas pode ser atribuída tanto à

remoção incompleta de células que permaneceram aderidas à superfície-teste quanto à morte ou estresse celular durante a secagem ou outras condições adversas (BEUCHAT et al., 2001b).



**Figura 1** - População de *Listeria monocytogenes* recuperada da superfície-teste do coco verde sem tratamento e submetido a diferentes tratamentos químicos, sendo a quantificação em meio não-seletivo (TSA-YE) e seletivo (OXA). Os dois meios utilizados na quantificação de células de cada tratamento diferem significativamente ( $p < 0,02$ ).

<sup>a</sup> A superfície-teste do coco verde não foi tratada ou foi imersa por 2 min em água destilada estéril, solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L e pH 6,5) ou solução de ácido peracético (80 mg/L) ou foi tratada com vapor super aquecido (117 °C) por 7 s ou flambada (1.150 °C) por 3 s.

A quantificação de *L. monocytogenes* no meio não-seletivo TSA-YE foi significativamente maior ( $p < 0,02$ ) do que no meio seletivo OXA, independentemente da condição de secagem (Figura 1). Isso indica que algumas células de *L. monocytogenes* estavam estressadas e não foram capazes de formar colônias visíveis na presença de substâncias seletivas do OXA. A diferença entre as contagens do meio não-seletivo para o meio seletivo, das amostras sem tratamento e das imersas em água foi de 0,66 log UFC e 0,46 log UFC, respectivamente. Presume-se que as células estressadas não foram removidas da superfície do coco verde pelo tratamento de imersão em água. Além disso, os tratamentos químicos com solução de hipoclorito de sódio e ácido peracético não

modificaram consideravelmente a população de *L. monocytogenes* com capacidade de se desenvolver somente no meio não-seletivo.

A interação entre a condição de secagem do inóculo na superfície do coco verde e o tratamento foi significativa ( $p < 0,004$ ). Em todas as repetições, os frutos das prateleiras inferiores das estufas a 35,5 e 37 °C, quando tratados com hipoclorito de sódio, tiveram menor recuperação da população de *L. monocytogenes* que os frutos da prateleira superior da estufa a 35,5 °C (Tabela 1). Apesar de a recuperação de células dos frutos sem tratamento e imersos em água também ter sido maior nos frutos provenientes da prateleira superior, as médias não diferiram significativamente ( $\alpha = 0,05$ ) daqueles das bandejas inferiores. Não houve diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) entre as médias de células recuperadas dos frutos provenientes das prateleiras inferiores das estufas a 35,5 e 37°C, em que os tempos de secagem foram similares.

**Tabela 1** - População de *Listeria monocytogenes* recuperada da superfície-teste do coco verde submetida a diferentes condições de secagem e tratamentos químicos

Prateleira	Tratamento <sup>a</sup>			
	Nenhum	Água estéril	Hipoclorito de sódio	Ácido peracético
Inferior (35,5 °C)	6,06 ± 1,03 <sup>b</sup> Aa	4,64 ± 0,85 Ab	1,87 ± 1,29 Ac	2,30 ± 0,43 Ac
Superior (35,5 °C)	6,98 ± 0,65 Aa	5,41 ± 0,40 Ab	4,81 ± 0,80 Bb	1,55 ± 0,78 Ac
Inferior (37 °C)	6,30 ± 0,73 Aa	4,57 ± 0,24 Ab	1,31 ± 0,87 Ac	1,74 ± 0,06 Ac

<sup>a</sup> A superfície-teste do coco verde não foi tratada ou foi imersa por 2 min em água destilada estéril, solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L e pH 6,5) ou solução de ácido peracético (80 mg/L).

<sup>b</sup> Média (Log UFC/superfície-teste do fruto) e desvio-padrão da população de *L. monocytogenes* quantificada em TSA-YE. As médias da mesma coluna seguidas por letras maiúsculas diferentes e da mesma linha seguidas por letras minúsculas diferentes diferem significativamente ( $\alpha = 0,05$ ).

O tempo de secagem ou evaporação das gotículas do inóculo dos frutos que estavam na prateleira superior da estufa a 35,5 °C (7 h) foi menor do que nas prateleiras inferiores das estufas a 35,5 °C (2 h) e a 37 °C (3 h). Isso pode ter ocorrido devido à maior umidade relativa na parte superior da estufa. O prolongamento do inóculo em uma condição de alta atividade de água pode ter reduzido o estresse celular durante a secagem ou proporcionado maior adesão celular na superfície do coco verde. A existência de células estressadas pode diminuir a resistência microbiana, superestimando a letalidade dos tratamentos de descontaminação (BEUCHAT et al., 2001b). A adesão bacteriana é um processo cuja intensidade das forças de associação com a superfície é aumentada com o tempo. As células de *L. monocytogenes* no biofilme são mais resistentes aos sanitizantes do que na forma séssil (FATEMI; FRANK, 1999; NORWOOD; GILMOUR, 2000; REINA et al., 2002).

### **Efeito dos tratamentos químicos na recuperação de *L. monocytogenes***

Os resultados da população de *L. monocytogenes* recuperada da superfície-teste dos cocos verdes sem tratamento e daqueles frutos submetidos aos tratamentos químicos e físicos, assim como as reduções ocasionadas por esses tratamentos são apresentadas na Tabela 2. A redução da população de *L. monocytogenes* em 1,55 log UFC/superfície-teste do fruto pela imersão do coco verde em água por 2 min pode ser atribuída ao desprendimento celular ocorrido durante esse tratamento. Entretanto, a água torna-se uma fonte potencial de contaminação cruzada ou recontaminação das frutas (VENKITANARAYANAN et al., 2002). Conseqüentemente, a função primária dos sanitizantes é manter a qualidade microbiológica da água (BRACKETT, 1999). Uma concentração de cloro residual de 50 mg/L em tampão de fosfato de potássio provocou mais de 5 reduções decimais de *L. monocytogenes* em 20 s (BRACKETT, 1987). Mas, nas aplicações comerciais, deve-se considerar a menor efetividade do cloro em superfícies, assim como o seu consumo e instabilidade em solução (DYCHDALA, 1991). Rodgers e outros (2004) determinaram o tempo de redução decimal de uma população de *L. monocytogenes* em solução de fosfato de sódio clorada (200

mg/L de cloro disponível) e ácido peracético (80 mg/L), encontrando valores de 27 e 70 s, respectivamente, ou seja, maior eficácia da solução clorada.

**Tabela 2** - População de *Listeria monocytogenes* recuperada da superfície-teste do coco verde sem tratamento e submetido a tratamentos químicos e físicos

Tratamento <sup>a</sup>	População (Log UFC/mL)	
	Recuperação	Redução <sup>b</sup>
Nenhum	6,39 ± 0,83 <sup>c</sup> a	
Água estéril	4,84 ± 0,66 b	1,55
Hipoclorito de sódio	2,55 ± 1,80 c	3,84
Ácido peracético	1,93 ± 0,54 d	4,47
Flambagem	< 0,70	> 5,69
Vapor superaquecido	< 0,70	> 5,69

<sup>a</sup> A superfície-teste do coco verde não foi tratada ou foi imersa por 2 min em água destilada estéril, solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L e pH 6,5) ou solução de ácido peracético (80 mg/L) ou foi tratada com vapor super aquecido (117 °C) por 7 s ou flambada (1.150 °C) por 3 s.

<sup>b</sup> Redução comparada com a população de *L. monocytogenes* recuperada da superfície-teste de coco verde sem tratamento.

<sup>c</sup> Média e desvio-padrão da população de *L. monocytogenes* submetida a diferentes condições de secagem do inóculo e quantificada em TSA-YE. As médias dos tratamentos seguidas por letras diferentes diferem significativamente ( $\alpha=0,05$ ).

Os tratamentos dos cocos verdes com hipoclorito de sódio e ácido peracético aumentaram significativamente ( $\alpha=0,05$ ) a eficácia da imersão em água, resultando numa redução da população inicial de *L. monocytogenes* em 3,84 e 4,47 log UFC/superfície-teste do fruto, respectivamente. A remoção física de células microbianas também pode aumentar consideravelmente a eficácia da imersão, como na esfregação, que foi empregado para recuperação de células da superfície-teste do coco verde ou outro tipo de tratamento mecânico. Os resultados dos tratamentos químicos indicam que a redução da população de *L.*

*monocytogenes* da superfície lateral do coco verde, nas condições experimentais estudadas, foi significativamente ( $\alpha=0,05$ ) maior pelo tratamento com ácido peracético (Tabela 2). Entretanto, na prateleira inferior das estufas a 35,5 e 37 °C não existiram diferenças significativas ( $\alpha=0,05$ ) entre os tratamentos com ácido peracético e hipoclorito. A maior eficácia do ácido peracético na superfície do coco verde pode estar relacionada às características hidrofóbicas de sua molécula. O ácido peracético é mais hidrofóbico que o hipoclorito (FATEMI; FRANK, 1999), possibilitando maior penetração nas multicamadas hidrofóbicas de cutícula da epiderme do coco verde. Entretanto, independentemente do sanitizante, a sua eficácia é limitada por diversos fatores, incluindo a molhagem incompleta da camada de cutícula (BRACKETT, 1987), a irregularidade superficial, a localização de microrganismos em estruturas protetoras (BURNETT; BEUCHAT, 2000) e a sensibilidade dos produtos frescos a tratamentos severos.

A comparação de resultados de tratamentos de descontaminação de frutas e hortaliças é limitada, devido às variações substanciais que existem nas condições experimentais. Essas variações incluem o tipo de produto, o microrganismo-teste, o preparo do inóculo, o método de inoculação, o armazenamento do produto antes do tratamento, as condições do tratamento, os procedimentos para recuperação e análise microbiológicas (BEUCHAT et al., 2001a). Wright e outros (2000) estudaram o efeito de diversos tratamentos químicos na descontaminação de maçãs inoculadas com *Escherichia coli* O157:H7 por imersão. O tratamento de imersão das maçãs em água, solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L e pH 6,5) e ácido peracético (80 mg/L) por 2 min resultou numa redução de 0,6; 2,1; e 2,8 log UFC/cm<sup>2</sup>. Rodgers e outros (2004) reportaram a redução da população de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* (população inicial de 6 log UFC/g), em níveis não-detectáveis em maçãs, melões, morangos e folhas de alface após 5 min de imersão em soluções de fosfato de sódio clorada (200 mg/L de cloro disponível) e ácido peracético (80 mg/L).

### **Efeito dos tratamentos físicos na recuperação de *L. monocytogenes***

O tratamento da superfície-teste do coco verde com vapor superaquecido e chama resultou numa redução na população de *L. monocytogenes* maior que 5,69 log UFC/superfície-teste do fruto (Tabela 2), ou seja, em níveis não-detectáveis (< 0,70 log UFC/superfície-teste do fruto). Os caldos de enriquecimento de amostras submetidas ao tratamento com vapor superaquecido turvaram após 24 h de incubação. As colônias observadas, após alíquotas dos caldos serem estriadas em TSA-YE e OXA, apresentavam características culturais distintas daquelas das cepas de *L. monocytogenes* do inóculo, mas similares a da microbiota de frutos não inoculados. Nos caldos de enriquecimento de amostras submetidas ao tratamento de flambagem, não foi observado nenhum tipo de turvação durante 48 h de incubação. Além disso, não foram observadas colônias nas placas de TSA-YE e OXA estriadas com alíquotas do caldo. Assim, dentre os tratamentos estudados, a flambagem foi o mais eficaz na descontaminação da superfície do coco verde.

As combinações de tempo-temperatura sugerida por Mazzota (2001) para a inativação de 5 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* no ponto frio de algumas hortaliças foram de 10 s a 75 °C ou um tratamento instantâneo (< 1 s) em temperaturas superiores a 82 °C. A imersão em água aquecida foi relatada por Pao e Davis (1999) para a descontaminação da superfície de laranjas, não alterando as características sensoriais do seu suco. As laranjas foram inoculadas com *E. coli*, e uma redução de 5 log UFC/cm<sup>2</sup> foi obtida pelo tratamento térmico a 80 °C por 1 min ou 70 °C por 2 min. Fleischman e outros (2001) verificaram que a eficácia do tratamento de descontaminação depende do procedimento de inoculação empregado. Em maçãs que receberam uma inoculação pontual de *E. coli* O157:H7, o tratamento de imersão em água a 95 °C por 30 s promoveu uma redução maior que 7 log UFC/g; já, nas maçãs que foram inoculadas por imersão, a redução ocasionada pelo tratamento de imersão foi de apenas 2,4 log UFC/g. Ukuku e outros (2004) reportaram que a imersão de melões por 1 min em água aquecida a 97 °C ou a combinação do tratamento térmico a 70 °C com solução de

5% de peróxido de hidrogênio são similares, ocasionando uma redução de *Salmonella* entre 3,6 e 3,8 log UFC/cm<sup>2</sup>.

A coloração da superfície do coco verde, na região de aquecimento direto, modificou-se durante os tratamentos físicos. No tratamento com vapor, formou-se um círculo escuro com 3,9 cm de diâmetro e, no tratamento com chama, um círculo claro, com diâmetro de 8,5 cm, concêntrico a um anel escuro com 1,4 cm de diâmetro.

A descontaminação da superfície do coco verde pela flambagem pode apresentar vantagens consideráveis sobre os tratamentos químicos convencionais, pois, além de ser mais rápido e eficaz, não utiliza água nem agentes químicos. A flambagem pode ser utilizada na descontaminação de várias frutas e hortaliças, especialmente na produção de sucos e produtos minimamente processados. As alterações sensoriais indesejáveis ocasionadas pela chama são minimizadas pelo curto período do tratamento. Entretanto, devem-se considerar a resistência à combustão e as características isolantes do pericarpo.

Os tratamentos físicos permitiram uma descontaminação pontual da superfície do coco verde, adequada para máquinas extratoras que atuam por perfuração. Na extração por corte transversal do fruto ou por corte paralelo ao seu cálice, geralmente se realiza uma descontaminação de toda a superfície externa do coco verde. Isso aumenta consideravelmente a área a ser tratada e, conseqüentemente, o tempo, o trabalho e os custos da operação.

A segurança da água de coco fresca fundamenta-se nas Boas Práticas Agrícolas e na lavagem do coco verde antes de sua sanitização, o que reduz a carga microbiana e as sujidades na superfície do fruto; nas Boas Práticas de Fabricação, o que minimiza o potencial de contaminação da bebida na extração e envase e, finalmente, na refrigeração da água de coco, o que retarda o desenvolvimento microbiano antes do consumo da bebida.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16 ed. Washington, 1992. 546 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washinton, D.C., 2001. 676 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington, D.C., 2001.

ARAÚJO, A. H.; FONTENE, A. M. M.; MOTA, A. P. M.; DANTAS, F. F.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Análise sensorial da água de coco in natura em comparação com a pasteurizada. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p. 3.44.

BEUCHAT, L. R.; FARBER, J. M.; GARRETT, E. H.; HARRIS, L. J.; PARISH, M. E.; SUSLOW, T. V.; BUSTA, F. K. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1079-1084, 2001a.

BEUCHAT, L. R.; HARRIS, L. J.; WARD, T. E.; KAJIS T. M. Development of a proposed standard method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1103-1109, 2001b.

BEUCHAT, L. R.; WARD, T. E.; PETTIGREW, C. A. Comparison of chlorine and a prototype produce wash product for effectiveness in Killing Salmonella and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 152-158, 2001c.

BEUCHAT, L. R.; ADLER, B. B.; LANG, M. M Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and

romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1238-1242, 2004.

BRACKETT, R. E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 999-1003, 1987.

BRACKETT, R. E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, n. 3, p. 305-311, 1999.

BURNETT, S. L.; BEUCHAT L. R. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 281-287, 2000.

DOYLE, M. E.; MAZZOTTA, A. S.; WANG, T.; WISEMAN, D. W.; SCOTT, V. N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 3, p. 410-429, 2001.

DYCHDALA, G. R. Chlorine and chlorine compounds. In: BLOCK S. S. **Disinfection, Sterilization, and Preservation**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 131-151.

FATEMI, P.; FRANK, J. F. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 7, p. 761-765, 1999.

FLEISCHMAN, G. J.; BATOR C.; MERKER R.; KELLER S. E. Hot water immersion to eliminate *Escherichia coli* O157H:H7 on the surface of whole apples: thermal effects and efficacy. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 4, p. 451-455, 2001.

FRASSETTI, J.; TÓRTORA, J. C. O.; GREGÓRIO, S. R. Aceitação da água de coco in natura e processada. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p. 3.87.

HARRIS, L. J.; FARBER, J. N.; BEUCHAT, L. R.; PARISH, M. E.; SUSLOW, T. V.; GARRET, E. H.; BUSTA, F. F. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce**. Chicago, 2003. v. 2. Disponível em: <<http://www.ift.org/cms/?pid=1000384>>. Acesso em: 16 fev. 2004.

HOFFMANN, F. L.; COELHO, A. R.; MANSOR, A. P., TAKAHASHI, C. M.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de amostras de água de coco vendidas por ambulantes na cidade de São João do Rio Preto - SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 87-92, 2002.

HOLLINGSWORTH, P. Functional beverage juggernaut faces tighter regulations. **Food Technology**, v. 54, n. 11, p. 50-54, 2000.

JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C.; NARAYANAN, C. S.; MATHEW, A. G. Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. **Journal of Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 203-207, 1986.

LEITE, C. C.; SANTANA, L. R. R.; SANT`ANA, M. E. B.; ASSIS, P. N. Avaliação microbiológica da água de coco produzida e comercializada na cidade de Salvador - BA. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16, 1998, Rio de Janeiro. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

LURIE, S. Postharvest heat treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v. 14, n. 3, p. 257-269, 1998.

MAZZOTTA, A. S. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in vegetables: evaluation of blanching processes. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 3, p. 385-387, 2001.

MELO, N. P. M.; CARDONHA, A. M. S.; OLIVEIRA, A. C. F. Qualidade microbiológica das águas de coco envasadas e comercializadas na cidade de Natal - RN. Resumos. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 101/105, p. 113-114, 2003.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 512-520, 2000.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. **Health Products and Food Branch. ISOLATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES FROM ALL FOOD AND ENVIRONMENTAL SAMPLES.** Government of Canada, January 2001. Disponível em: <<http://www.hc-sc.ca/food.aliment>>. Acesso em: 2 nov. 2003.

PAO, S.; DAVIS, C. L. Enhancing microbiological safety of fresh orange juice by fruit immersion in hot water and chemical sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 7, p. 756-760, 1999.

REINA, L. D.; FLEMING, H. P.; BREIDT, F. J. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 12, p. 1881-1887, 2002.

RENTERGHEM, B. VAN; HUYSMAN, F.; RYGOLE, R.; VERSTRAETE, W. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 3, p. 211-217, 1991.

RODGERS, S. L.; CASH, J. N.; SIDDIQ, M.; RYSER, E. T. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries and cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 4, p. 721-731, 2004.

SANCHEZ, C. G. **Tecnologia da Combustão.** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Departamento de Engenharia Térmica e de Fluidos, Campinas, 2002. Apostila

SREBERNISH, S. M. **Caracterização física e química da água de fruto de coco (*Cocos nucifera*), variedades Gigante e Híbrido PB-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco.** 1998. 198p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

VENKITANARAYANAN, K. S.; LIN, C-H.; BAILEY, H.; DOYLE, M. P. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 100-105, 2002.

UKUKU, D. O.; PILIZOTA, V.; SAPERS, G. M. Effect of hot water and hydrogen peroxide treatments on survival of *salmonella* and microbial quality of whole and fresh-cut cantaloupe. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 3, p. 432-437, 2004.

WALTER, E. H. M.; KUAYE, A. Y.; KABUKI D. Y.; ESPER L. M. R. 2005 **Desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em Água de Coco Fresca.** In: Descontaminação da superfície do coco verde por métodos físicos e químicos e desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em água de coco fresca. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

WEI, C.-I.; COOK, D. L.; KIRK, J. R. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technology**, v. 39, n. 107-115, January, 1985.

WILLIAMS, D. C.; LIM, M. H.; CHEN, A. O.; PANGBORN R. M.; WHITAKER, J. R. Blanching of vegetables for freezing-which indicator enzyme to choose. **Food Technology**, v. 40, p.130-140, June, 1986.

WRIGHT, J. R.; SUMNER, S. S.; HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D.; ZOECKLEIN, B. W. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on apples using wash and chemical sanitizer treatments. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 20, n. 2, p. 120-126, 2000.



**CAPÍTULO III**

**Desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em Água de Coco Fresca**



## **Desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em Água de Coco Fresca**

**Eduardo H. M. Walter, Arnaldo Y. Kuaye, Dirce Y. Kabuki, Luciana M. R. Esper**

### **RESUMO**

O desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em amostras de água de coco fresca (pH 4,9) submetida a diferentes temperaturas de incubação (4, 10 e 35 °C) foi analisado neste estudo. A população média de *L. monocytogenes* na água de coco experimentalmente inoculada foi de 2,95 log UFC/mL, e as populações máximas alcançadas na fase estacionária das amostras incubadas a 4, 10 e 35 °C foram de até 7,08; 7,72; e 8,32 log UFC/mL, respectivamente. As curvas de crescimento foram ajustadas utilizando-se a equação de Gompertz modificada. O tempo de latência (fase lag) e o tempo de geração foram estimados a partir dos parâmetros Gompertz. Em amostras de água de coco incubadas a 4, 10 e 35 °C os menores tempos de latência foram de 12,7 dias, 4,2 dias e 3,8 h e os menores tempos de geração, de 2,7 dias, 10,7 h e 49,3 min, respectivamente. Assim, a água de coco é um substrato propício à sobrevivência e desenvolvimento de *L. monocytogenes*.

## 1. INTRODUÇÃO

A água de coco é o endosperma líquido que se encontra na cavidade do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera* L.). Nas regiões litorâneas dos países tropicais, a água de coco é uma bebida muito apreciada, sendo utilizada por desportistas ou no tratamento de enfermidades diarréicas, como solução de hidratação oral (COLLARES; SOUZA, 1985). O apelo natural da água de coco, associado às suas características sensoriais e nutricionais, tem despertado o interesse global pela bebida (HOLLINGSWORTH, 2000). Diante desses aspectos, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação depositaram uma patente de processamento por microfiltração da bebida (FAO, 2001).

A água de coco é tradicionalmente consumida diretamente do fruto, mas, devido às dificuldades no transporte e abertura da fruta, a bebida é convenientemente envasada. O processamento industrial da bebida virtualmente elimina todos os microrganismos que possam causar algum tipo de doença. Entretanto, as características sensoriais da água de coco fresca são consideradas superiores à da bebida pasteurizada ou comercialmente estéril (ARAÚJO et al., 2000; FRASSETTI et al., 1998).

A composição química da água de coco, com altos teores de açúcares e sais minerais (JAYALEKSHMY et al., 1996), pode propiciar condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano, principalmente de bactérias. *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* foram encontrados em populações de até  $1,6 \times 10^5$  UFC/mL (LEITE et al., 1998) e  $8,0 \times 10^4$  UFC/mL (HOFFMANN et al., 2002) em água de coco comercializada sob refrigeração, respectivamente. Já Melo e outros (2003) detectaram *Escherichia coli* e *Salmonella* na bebida não-pasteurizada.

*L. monocytogenes* é potencialmente preocupante em produtos frescos e armazenados sob refrigeração, devido à sua capacidade de se desenvolver nessas condições e à sua ampla distribuição no ambiente agrícola (RENTERGHEM et al., 1991). Além disso, esse microrganismo possui a habilidade de sobreviver por mais tempo em condições ambientais adversas, em comparação com muitas das bactérias patogênicas não-esporogênicas de relevância para a

saúde pública (FENLON, 1999). As listerioses estão associadas a uma alta taxa de mortalidade entre alguns grupos de risco, incluindo mulheres grávidas, neonatos e pessoas com o sistema imunológico comprometido (SLUTSKER; SCHUCHAT, 1999).

A influência do pH e da temperatura de armazenamento no comportamento de *L. monocytogenes* foi analisada em alguns sucos de fruta. Abbey e outros (1988) reportaram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em suco de melancia incubado a 25 °C e a inativação a 5 °C. Parish e Higgins (1989) estudaram o comportamento de *L. monocytogenes* em sucos de laranja microfiltrados, com pH ajustado e temperaturas de incubação de 4 e 30 °C. Nas amostras com pH na faixa de 3,6 e 4,6 ocorreu uma redução da população, mas em pH 5,0 houve aumento. Comi e outros (2000) estudaram o comportamento de *Bacillus* sp., *Campylobacter coli*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* e *Yersinia enterocolitica* em sucos de uva (pH 4,4), maçã (pH 3,7), abacaxi (pH 4,1) e laranja (pH 3,8) incubados a 4, 20, 30 e 37 °C, com uma população inicial de 10<sup>4</sup> UFC/mL. Células viáveis dos microrganismos estudados não foram detectadas entre 6 e 7 dias de incubação, não ocorrendo desenvolvimento durante esse período. Han e Linton (2004) reportaram que, em suco de morango (pH 3,6) inoculado com *L. monocytogenes* e incubado por 3 dias, ocorreu uma redução de menos de 1 ciclo logarítmico a 4 °C e de mais de 6 ciclos logarítmicos a 37 °C. Já Penteado e Leitão (2004) verificaram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em polpas de melão (pH 5,0), melancia (pH 5,5) e mamão (pH 4,9) armazenados a 10, 20 e 30 °C.

Apesar de se reconhecer a habilidade de *L. monocytogenes* em se desenvolver ou manter a sua viabilidade por longos períodos em sucos de fruta, o comportamento desse microrganismo em água de coco armazenada sob refrigeração e em temperaturas mais elevadas necessita ser investigado. O objetivo deste estudo foi analisar o comportamento de *L. monocytogenes* experimentalmente inoculado em água de coco submetida a diferentes temperaturas de incubação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Cocos verdes**

Os ensaios experimentais foram conduzidos em cocos verdes (*Cocos nucifera* L.) da variedade Anã, provenientes do Estado do Espírito Santo e adquiridos na Central de Abastecimento de Campinas. Os cocos verdes (54 frutos), com cerca de sete meses de maturação, foram visualmente selecionados nos cachos, escolhendo-se aqueles com poucas lesões mecânicas. Esses frutos foram mantidos à temperatura ambiente por um dia, quando, então, procedeu-se aos ensaios experimentais.

### **2.2. Descontaminação dos frutos e extração da água de coco**

Os cocos verdes (5 frutos) foram inicialmente lavados pela escovação de sua superfície externa com um detergente alcalino (Det Limp S32, Farquill Comércio e Indústria) e, em seguida, drenados. A descontaminação do fruto foi completada pela flambagem de sua superfície lateral ao redor do cálice, de acordo com Walter e Kuaye (2005). Os frutos foram transferidos para uma câmara biossegura, do tipo fluxo laminar, e cortados paralelamente ao cálice, com uma faca estéril, de modo que o seu mesocarpo ficasse exposto. Em seguida, outra fatia superficial do mesocarpo foi removida e o fruto, perfurado com um furador cilíndrico de aço inoxidável. A água de coco foi extraída assepticamente com um dispersador (Wheaton 844004) estéril e colocada num frasco também estéril. Uma alíquota de 5 mL de água de coco foi removida para verificação de sua esterilidade. O restante da água de coco foi transferido para dois frascos com rosca e armazenado a -18 °C, por até 10 dias. Na noite anterior a cada repetição dos ensaios experimentais, um frasco com água de coco foi retirado do congelador. A água de coco descongelada foi colocada em três frascos estéreis (99 mL/frasco) e mantida em banhos d'água nas temperaturas de incubação (4, 10 e 35 °C) por 2 h, até a inoculação.

### 2.3. Teste de esterilidade da água de coco

A esterilidade da água de coco foi testada em triplicata pela transferência de uma alíquota de 5 mL para um frasco com 45 mL de caldo tripticase de soja (Difco) suplementado com extrato de levedura (Biobrás), com incubação dessa mistura a 35 °C por 5 dias. Esse período de incubação foi seguido de observações procurando evidenciar qualquer turvação na mistura, indicadora de desenvolvimento microbiano e ausência de esterilidade.

### 2.4. Microrganismos-teste

O inóculo foi composto por 5 cepas de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, sorovar 1/2a, isolada de frango; IOC 1359, sorovar 4b, isolada de queijo artesanal; IOC 1527, sorovar 1/2a, isolada de carne cozida congelada; IOC 1898, sorovar 1/2a, isolada de espinafre; Scott A, sorovar 4b, isolado humano). A primeira e a segunda cepa IOC foram obtidas da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz e a amostra originária de espinafre da Universidade de São Paulo. As cepas de *L. monocytogenes* tiveram a sua identificação confirmada por meio de testes bioquímicos (PAGOTTO et al., 2001) e foram examinadas por seu antagonismo mútuo (BEUCHAT et al., 2001c). As culturas foram mantidas a 4 °C em ágar tripticase de soja (Difco) suplementado com extrato de levedura (Biobrás).

### 2.5. Preparo do inóculo

As 5 cepas de *L. monocytogenes* foram cultivadas independentemente em 10 mL de caldo tripticase de soja (TSB) suplementado com extrato de levedura (YE), com incubação a 35 °C por 24 h. Alíquotas das culturas foram transferidas mais duas vezes para o TSB-YE, com a mesma alça de inoculação, e em intervalos sucessivos de 24 h. As culturas foram centrifugadas (2.000 x *g* por 15 min, à temperatura ambiente), sendo o sobrenadante descartado, e o sedimentado, lavado com 10 mL de água peptonada 0,1%. As massas celulares foram coletadas após uma nova centrifugação e ressuspensas em 10 mL de

água peptonada 0,1%. Alíquotas das 5 suspensões, de mesmo volume, foram combinadas e formaram uma mistura que teve a densidade medida em Densimat (BioMerieux). O preparo do inóculo, com aproximadamente  $10^5$  UFC/mL, foi finalizada pela diluição seriada (1:10), em água peptonada 0,1%, de uma alíquota de 1 mL da mistura proveniente do Densimat.

As populações de *L. monocytogenes* na mistura e nas 5 suspensões individuais foram quantificadas de acordo com o procedimento descrito no tópico subsequente.

## **2.6. Inoculação e quantificação de *Listeria monocytogenes***

As amostras de água de coco (99 mL), mantidas à temperatura de 4, 10 e 35 °C, foram inoculadas com 1 mL da suspensão de *L. monocytogenes* ( $10^5$  UFC). Os frascos foram agitados por 10 s, sendo uma alíquota de água de coco retirada para determinação da população inicial de *L. monocytogenes*. As alíquotas de água de coco (0,1 mL em duplicata), ou de suas diluições seriadas (1:10) em água peptonada 0,1%, se necessário, foram inoculadas na superfície de ágar tripticase de soja (Difco) suplementado com extrato de levedura. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e as colônias, contadas em seguida. A frequência das demais quantificações foi ajustada para se observarem as fases lag, logarítmica e estacionária da curva de crescimento. As amostras a 4, 10 e 35 °C foram analisadas em intervalos sucessivos de pelo menos 6 dias, 24 h e 6 h, respectivamente. Amostras de água de coco não-inoculada foram mantidas nas temperaturas-teste, para análise da sua esterilidade durante cada um dos períodos de incubação.

## **2.7. Análises químicas e físico-químicas**

A água de coco foi submetida às seguintes análises físico-químicas: concentração do íon hidrogênio (pH), em pHmetro Digimed modelo DM-20 e de sólidos solúveis (°Brix), em refratômetro Carl Zeiss (Jena) modelo 32-G 110d. As análises químicas consistiram na determinação de acidez titulável, glicídios

redutores e glicídios totais, sendo realizadas de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

## 2.8. Modelagem e análise estatística

Os ensaios experimentais foram realizados em duplicata. As curvas de crescimento foram geradas utilizando-se a equação de Gompertz modificada (GIBSON et al., 1987) em conjunto com um programa de regressão não-linear do STATISTICA, versão 6.0. Os parâmetros calculados para a equação de Gompertz foram utilizados para estimar o tempo de latência (fase lag) e o tempo de geração de cada curva de crescimento.

A equação de Gompertz é dada por:

$$L(t) = A + Ce^{-e^{-B(t-M)}}$$

Nessa equação, " $L(t)$ " é a contagem, na base logarítmica, da população de bactérias no tempo " $t$ ", " $A$ " é a assíntota da contagem logarítmica das bactérias quando o tempo decresce indefinidamente, " $C$ " é a assíntota da quantidade de crescimento quando o tempo aumenta indefinidamente, " $M$ " é o tempo quando a taxa de crescimento absoluta é máxima e " $B$ " é a taxa de crescimento relativo em  $M$ . As equações cinéticas derivadas da equação de Gompertz foram as seguintes:

$$\text{tempo de latência} = M - 1/B;$$

$$\text{tempo de geração} = \text{Log}(2)e/BC.$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições experimentais estudadas, o teste de esterilidade de 3 amostras de 5 mL de água de coco e as análises das amostras não-inoculadas, que foram incubadas nas diferentes temperaturas estudadas, indicaram a ausência de *L. monocytogenes* ou outros contaminantes na bebida. Isso indica que os procedimentos utilizados para a descontaminação da superfície do coco verde, abertura do fruto e extração da água de coco foram eficazes e possibilitaram a obtenção asséptica da bebida. Apesar de tecidos internos de frutas e hortaliças sadias serem tipicamente considerados inócuos, existem relatos da presença de bactérias, geralmente em baixas concentrações, dentro de vegetais aparentemente sadios (SAMISH et al., 1963; MENELEY; STANGHELLINI, 1974).

**Tabela 1** - Características químicas e físico-químicas da água de coco

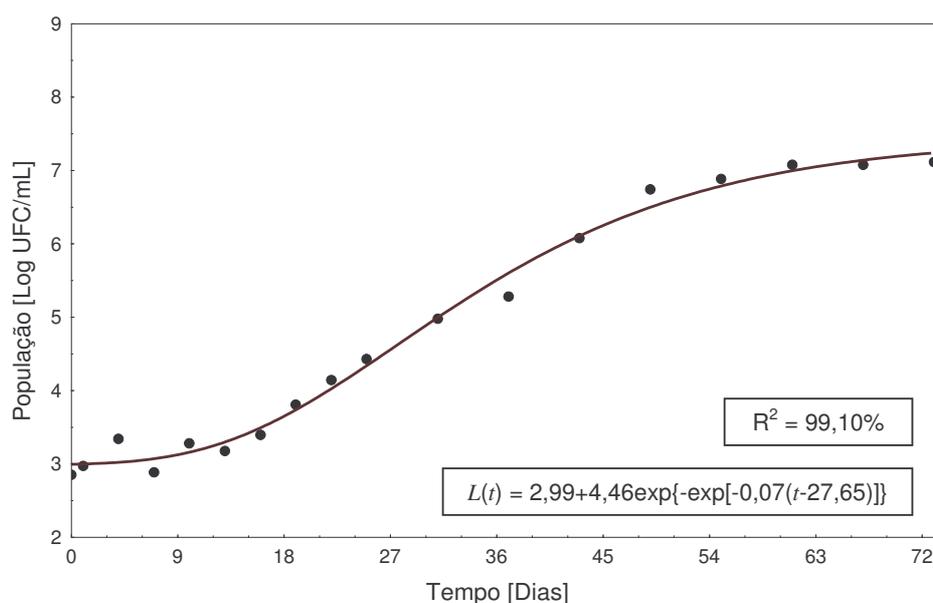
pH	4,87 ± 0,01 <sup>a</sup>
Sólidos solúveis [°Brix]	5,47 ± 0,06
Acidez titulável [%]	1,12 ± 0,08
Glicídios totais [%]	3,98 ± 0,02
Glicídios redutores [%]	3,97 ± 0,04

<sup>a</sup> Resultados expressam a média e o desvio-padrão obtidos na análise da água de coco.

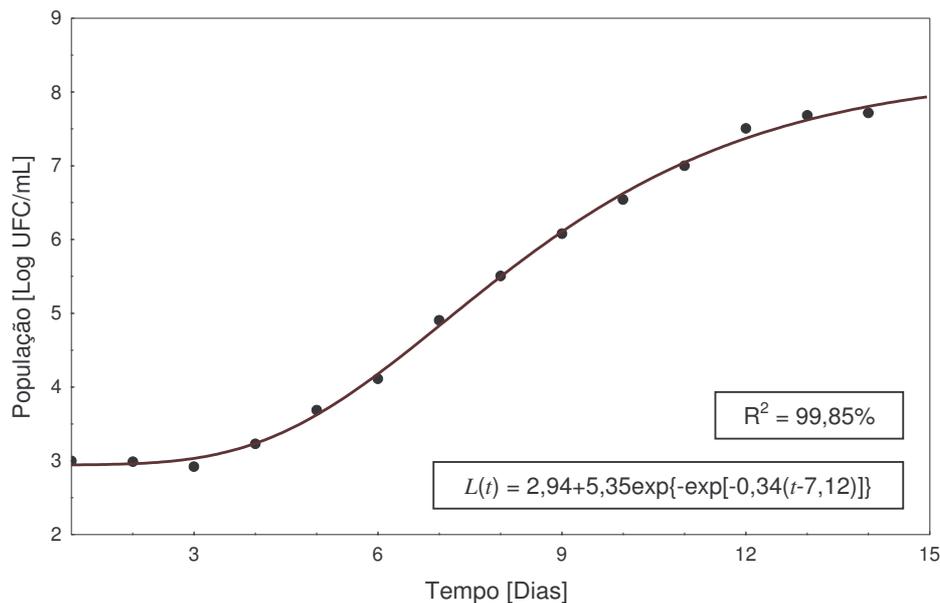
A composição físico-química e química da água de coco (Tabela 1) são propícias à sobrevivência e desenvolvimento de *L. monocytogenes* (Figuras 1 a 3). Os carboidratos são essenciais para o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, sendo os glicídios redutores da água de coco, particularmente a glicose, prontamente fermentáveis. O principal ácido presente na água de coco (variedades Gigante e Híbrida PB-121) é o ácido málico (SREBERNICH, 1998). Buchanan e Golden (1998) reportaram que o ácido málico estimula o

desenvolvimento de *L. monocytogenes* em certas combinações de pH e concentração.

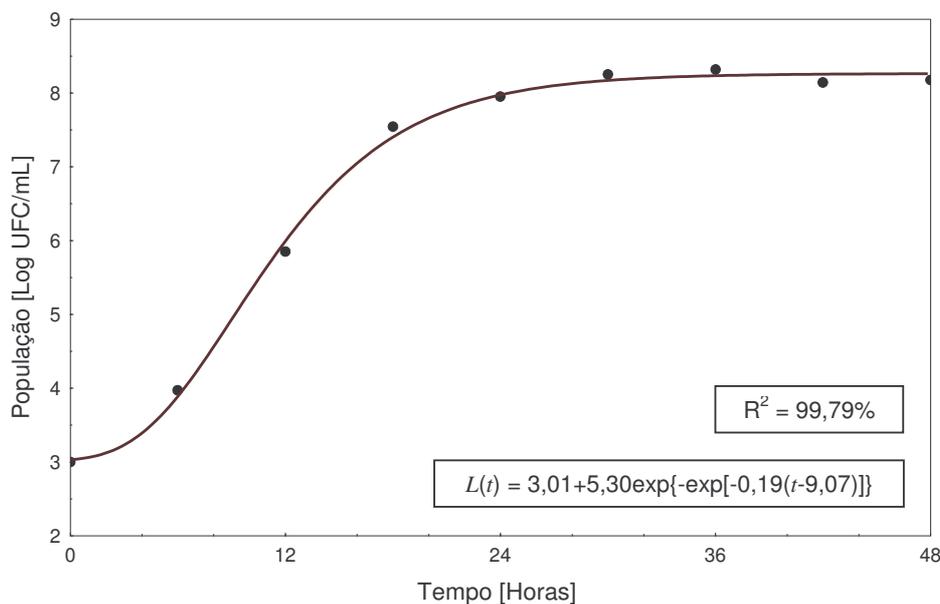
A água de coco passa por mudanças substanciais em sua composição durante o desenvolvimento do fruto (JAYALEKSHMY et al., 1996; SREBERNICH, 1998). Além do grau de maturação, outros fatores, incluindo a região produtora, a época do ano (ARAGÃO et al., 2002) e até a localização do fruto no cacho (MEDINA et al., 1980), influenciam a composição da bebida, podendo alterar o comportamento de *L. monocytogenes* e outros microrganismos na água de coco. Em suco de laranja microfiltrado e incubado a 30 °C, o incremento do pH de 4,8 para 5,0 diminuíram o tempo de geração e aumentou a população máxima de *L. monocytogenes* na fase estacionária (PARISH e HIGGINS, 1989).



**Figura 1** - Desenvolvimento de *L. monocytogenes* em água de coco incubada a 4 °C, estimado pela equação de Gompertz modificada.



**Figura 2** - Desenvolvimento de *L. monocytogenes* em água de coco incubada a 10 °C, estimado pela equação de Gompertz modificada.



**Figura 3** - Desenvolvimento de *L. monocytogenes* em água de coco incubada a 35 °C, estimado pela equação de Gompertz modificada.

A correlação entre os dados experimentais e as curvas de crescimento (Figuras 1 a 3) indica que as equações de Gompertz que foram estimadas para cada temperatura de incubação estavam em concordância com as observações experimentais. Os coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para o ajuste do modelo são

apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. As curvas de crescimento das Figuras 1, 2 e 3 são das repetições experimentais que apresentaram o menor tempo de latência, em cada temperatura de incubação estudada. O tempo de latência e o tempo de geração diminuíram com o aumento da temperatura de incubação (Tabela 2). Os tempos de geração nas diferentes temperaturas de incubação de *L. monocytogenes* em água de coco (pH 4,8) foram próximos aos encontrados em caldo tripticase de soja (pH 7,0) (PETRAN; ZOTTOLA, 1989). A temperatura de incubação também influenciou a população máxima de *L. monocytogenes*. A população na fase estacionária tendeu a ser menor com a diminuição da temperatura. Rosenow e Marth (1987) também verificaram que a aproximação da faixa ótima (30 a 37 °C) de desenvolvimento de *L. monocytogenes* aumentou a população máxima em creme de leite e no leite desnatado, integral e achocolatado.

**Tabela 2** - Parâmetros biológicos de *L. monocytogenes* em água de coco submetida a diferentes temperaturas de incubação

Parâmetros Biológicos	Temperatura de Incubação		
	4 °C	10 °C	35 °C
Tempo de latência <sup>a</sup> (fase lag)	12,7 <sup>c</sup> e 14,9 <sup>d</sup> dias	4,2 e 5,5 dias	3,8 e 4,4 h
Tempo de geração <sup>a</sup>	2,7 e 4,0 dias	10,7 e 13,3 h	49,3 e 64,5 min
População máxima <sup>b</sup> [Log UFC/mL]	7,08 e 6,66	7,72 e 7,62	8,32 e 8,15

<sup>a</sup> Parâmetros estimados pela equação de Gompertz.

<sup>b</sup> Parâmetro obtido pela quantificação de *L. monocytogenes* em água de coco.

<sup>c</sup> Parâmetros estimados na primeira repetição.

<sup>d</sup> Parâmetros estimados na segunda repetição.

A alteração da coloração da água de coco é um dos principais problemas tecnológicos da bebida processada termicamente. Esse fenômeno é caracterizado por uma coloração rosada que se apresenta durante o armazenamento da água de coco, estando associada à atividade de enzimas naturalmente presentes na

bebida (CAMPOS et al., 1996). Nas amostras de água de coco incubadas a 35 e 10 °C não foi observado o aparecimento da coloração rosada durante 48 h e 15 dias, respectivamente, mas a 4 °C essa alteração ocorreu após 70 dias de incubação. Isso indica que a atividade endoenzimática não pode ser correlacionada com a atividade microbiana na água de coco fresca.

Os produtores de água de coco estimam um período de comercialização da água de coco fresca mantida sob refrigeração de cerca de 5 dias. As curvas de crescimento (Figuras 1 a 3) indicam que a refrigeração retarda, mas não inibe o desenvolvimento de *L. monocytogenes* nas condições experimentais. A refrigeração pode prolongar a fase lag, porém o curto tempo de latência e o rápido tempo de geração relativo de *L. monocytogenes* em água de coco incubada a 35 °C indicam que o abuso de temperatura pode aumentar consideravelmente o nível desse perigo potencial.

Numa situação comercial, deve-se considerar o efeito da microbiota contaminante oriunda da epiderme do fruto, equipamentos e outras superfícies. *L. monocytogenes* e outros microrganismos patogênicos podem ser inibidos ou até mesmo eliminados pela ação da microbiota competidora ou antagonista, que é naturalmente encontrada nas frutas e hortaliças (SCHUENZEL; HARRISON, 2002). Além disso, a atividade de uma microbiota diversificada pode fornecer indicações de condições inadequadas de obtenção da água de coco, abuso de temperatura ou tempo prolongado de armazenamento, por meio de deteriorações.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEY, S. D.; HEATON, E. K.; GOLDEN, D. A.; BEUCHAT, L. R. Microbiological and sensory quality changes in unwrapped and wrapped sliced watermelon.

**Journal of Food Protection**, v. 51, n. 7, p. 531-533, 1988.

ARAÚJO, A. H.; FONTENE, A. M. M.; MOTA, A. P. M.; DANTAS, F. F.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Análise sensorial da água de coco in natura em comparação com a pasteurizada. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p. 3.44.

ARAGÃO, W. M.; RESENDE, J. M.; CRUZ, E. M. O.; REIS, C. S.; SAGGIN, O. J.; J. A. ; MOREIRA, W. A.; PAULA, F. R.; LIMA FILHO, J. M. P. Fruto do coqueiro para consumo natural. In: **Coco**: Pós-Colheita. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 19-25. (Frutas do Brasil, 29)

BEUCHAT, L. R.; WARD, T. E.; PETTIGREW, C. A. Comparison of chlorine and a Prototype Produce Wash Product for Effectiveness in Killing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Alfalfa Seeds. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 152-158; 2001.

BUCHANAN, R. L.; GOLDEN, M. H. Interaction between pH and malic acid concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Safety**, v. 18, n. 1, p. 37-48, 1998.

CAMPOS, C. F.; SOUZA, P. E. A.; COELHO, J. V.; GLORIA, M. B. A. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n. 6, p. 487-500, 1996.

COLLARES, E. F.; SOUZA, N. M. Solução alternativa para hidratação oral em pediatria: Composição de refrigerantes, de infusões e de água de coco. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 3, p. 46-49, 1985.

COMI, G.; COCOLIN, L.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; CATTANEO, M.  
Microorganisms behaviour in purposely contaminated fruit juices. **Industrie delle Bevande**, v. 29, n. 167, p. 237-246, 2000.

FENLON, D. R. *Listeria monocytogenes* in the natural environment In: **Listeria, Listerioses and Food Safety**. Ed. 2. Marcel Dekker: New York. 1999. p. 21-38.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, Morton, S; Giuseppe, A. **Coconut beverage**. n. GB 2318969, 13 mai. 1998. Disponível em:  
<<http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=GB2318969&F=8>>.  
Acesso em: 18 set. 2004.

FRASSETTI, J.; TÓRTORA, J. C. O.; GREGÓRIO, S. R. Aceitação da água de coco in natura e processada. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p. 3.87

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extente of growth pf *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, n. 6, p. 479-490, 1987.

HAN, Y.; LINTON, E. H. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in strawberry juice and acidified media at different pH values and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 11, p. 2443-2449, 2004.

HARRIS, L. J.; FARBER, J. N.; BEUCHAT, L. R.; PARISH, M. E.; SUSLOW, T. V.; GARRET, E. H.; BUSTA, F. F. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce**. Chicago, 2003. v. 2. Disponível em: <<http://www.ift.org/cms/?pid=1000384>>. Acesso em: 16 fev. 2004.

HOFFMANN, F. L.; COELHO, A. R.; MANSOR, A. P., TAKAHASHI, C. M.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de amostras de água de coco vendidas por ambulantes na cidade de São João do Rio Preto - SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 87-92; 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo, 1985. v.1.

HOLLINGSWORTH, P. Functional beverage juggernaut faces tighter regulations. **Food Technology**, v. 54, n. 11, p. 50-54; 2000.

JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C.; NARAYANAN, C. S.; MATHEW, A. G. Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. **Journal of Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 203-207; 1986.

LEITE, C. C.; SANTANA, L. R. R.; SANT`ANA, M. E. B.; ASSIS, P. N. Avaliação microbiológica da água de coco produzida e comercializada na cidade de Salvador - BA. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16, 1998, Rio de Janeiro. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

MEDINA, J. C.; GARCIA, J. L. M.; DE MARTIN, Z. J.; KATO, K.; TERUO, P.; TURRATTI, J. M.; SANTOS, L.C.; SILVA, M. T. C.; CANTO, W. L.; BICUDO NETO, L. C.; MORETI, V. A. **Coco:** da cultura ao processamento e comercialização. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1980. 285 p. (Série Frutas Tropicais - 5)

MELO, N. P. M.; CARDONHA, A. M. S.; OLIVEIRA, A. C. F. Qualidade microbiológica das águas de coco envasadas e comercializadas na cidade de Natal - RN. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 101/105, p. 113-114, 2003.

MENELEY, J.C.; STANGHELLINI, M.E. Detection of enteric bacteria within locular tissue of healthy cucumbers. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 6, p. 1267-1268, 1974.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. **Health Products and Food Branch. ISOLATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES FROM ALL FOOD AND ENVIRONMENTAL SAMPLES.** Government of Canada, January 2001. Disponível em:<<http://www.hc-sc.ca/food.aliment>>. Acesso em: 2 nov. 2003.

PARISH M. E.; HIGGINS, D. P. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model Broth Systems. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 3, p. 144-147, 1989.

PENTEADO, A. L.; LEITÃO, M. F. F. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 89-94, 2004.

PETTRAN, R. L.; ZOTTOLA, E. A. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Science**. v. 45, n. 2, p. 456-460, 1989.

RENTERGHEM, B. VAN; HUYSMAN, F.; RYGOLE, R. E VERSTRAETE, W. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 3, p. 211-217, 1991.

ROSENNOW, W. M.; MARTH, E. H. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4°, 8°, 13°, 21° and 35°C. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 6, p. 452-559, 1987.

SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. The microflora within the tissue of fruit and vegetables. **Journal of Food Science**. v. 28, n. 3, p. 259-266, 1963.

SREBERNISH, S. M. **Caracterização física e química da água de fruto de coco (*Cocos nucifera*), variedades Gigante e Híbrido PB-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco.** 1998. 198p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SCHUENZEL, K.M.; HARRISON, M.A. Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. **Journal of Food Protection**. v. 65, n. 12, p. 1909-1915, 2002.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listerioses in humans. In: **Listeria, Listerioses and Food Safety**. Ed. 2. Marcel Dekker: New York, 1999. p. 75-96

WALTER, E. H. M.; KUAYE, A. Y. 2005 **Descontaminação da superfície do coco verde por métodos físicos e químicos**. In: Descontaminação da superfície do coco verde por métodos físicos e químicos e desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em água de coco fresca. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005



## CONCLUSÃO GERAL

Diante dos resultados encontrados, pode-se concluir o seguinte:

- A imersão em água, solução de hipoclorito de sódio (200 mg/L, pH 6,5) e solução de ácido peracético (80 mg/L) por 2 min reduzem a população inicial de *Listeria monocytogenes* em 1,55; 3,84; e 4,47 log UFC/superfície-teste do fruto, respectivamente. Apesar do enxágue do coco verde reduzir a sua contaminação superficial, a água pode se tornar uma fonte potencial de contaminação cruzada ou recontaminação do fruto. Conseqüentemente, a função primária dos sanitizantes é manter a qualidade microbiológica da água. Além disso, os sanitizantes aumentam consideravelmente a eficácia da imersão, sendo o ácido peracético aquele que promoveu a maior redução de *L. monocytogenes*. Essa descontaminação pode ser ampliada pela combinação com procedimentos de remoção física de células microbianas, como a escovação.
- Os tratamentos de flambagem (1.150°C) por 3 s e com vapor superaquecido (117 °C) por 7 s causaram uma redução maior que 5,69 log UFC de *L. monocytogenes*/superfície-teste do fruto. A flambagem, além de reduzir a população de *L. monocytogenes* em níveis não-detectáveis, “virtualmente” pode destruir a microbiota superficial do coco verde, possibilitando a obtenção asséptica de água de coco. Já o tratamento com vapor superaquecido, nas condições experimentais estudadas, não foi capaz de eliminar a microbiota superficial do fruto. Assim, a flambagem foi considerada o tratamento mais eficaz na descontaminação da superfície do coco verde.
- A flambagem pode apresentar vantagens consideráveis sobre os tratamentos químicos convencionais, pois, além de ser mais rápida e eficaz, não utiliza água nem agentes químicos. Este tratamento pode ser adaptado para a descontaminação de vários produtos, especialmente na produção de sucos e produtos minimamente processados, em que se descarta o pericarpo do fruto ou a casca da hortalíça. As alterações sensoriais indesejáveis ocasionadas pela chama são minimizadas pelo curto período do tratamento. Entretanto, devem-se

considerar a resistência à combustão e as características isolantes do pericarpo do fruto ou casca da hortaliça.

- A água de coco é um substrato propício à sobrevivência e desenvolvimento de *L. monocytogenes*. Em amostras de água de coco incubadas a 4, 10 e 35 °C os menores tempos de latência (fase lag) foram de 12,7 dias, 4,2 dias e 3,8 h e os menores tempos de geração, de 2,7 dias, 10,7 h e 49,3 min, respectivamente. A refrigeração retarda, mas não inibe o desenvolvimento de *L. monocytogenes* na bebida. O curto tempo de latência e o rápido tempo de geração de *L. monocytogenes* em água de coco incubada a 35 °C indicam que o abuso de temperatura pode aumentar consideravelmente o nível desse perigo potencial.