

ANGIE DAHIANA DUQUE RODRÍGUEZ

**TRANSFERÊNCIA E MULTIPLICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* e
Listeria fleischmannii subsp. *coloradonensis* EM MELÃO DURANTE AS
ETAPAS DE SANITIZAÇÃO E ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINA GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D946t Duque Rodríguez, Angie Dahiana, 1985-
2017 Transferência e multiplicação de *Listeria monocytogenes* e
Listeria fleischmannii subsp. coloradonensis em melão durante
as etapas de sanitização e estocagem sob refrigeração / Angie
Dahiana Duque Rodríguez. – Viçosa, MG, 2017.
xiv, 88f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.75-88.

1. Tecnologia de alimentos. 2. *Listeria monocytogenes*. 3.
Listeria fleischmannii subsp. coloradonensis. 4. Melão.
5. Alimentos - Contaminação. 6. Bactérias. 7. Alimentos -
Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Ciência e
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 664

ANGIE DAHIANA DUQUE RODRÍGUEZ

TRANSFERÊNCIA E MULTIPLICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* e *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* EM MELÃO DURANTE AS ETAPAS DE SANITIZAÇÃO E ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

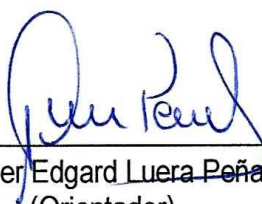
APROVADA: 13 de fevereiro de 2017.



Luís César da Silva



Nélio José de Andrade
(Coorientador)



Wilmer Edgard Luera Peña
(Orientador)

*“O entusiasmo é a maior força da alma.
Conserva-o e nunca te faltará poder para conseguires o que desejas”*

Napoleão Bonaparte

*A Deus, ofereço
A meus pais William e Deyanira, dedico com todo meu amor.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização desse curso.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela minha formação.

Ao professor Wilmer Edgar, pelos ensinamentos, orientação, incentivo, oportunidades concedidas, amizade e conselho durante os momentos difíceis durante este processo de formação acadêmica e pessoal.

Ao professor Nélcio, pelos ensinamentos, orientação, disposição, generosa colaboração, valiosas sugestões, incentivo e contribuição à melhoria do trabalho.

Ao professor Alfonso, pelos ensinamentos, orientação, disposição e generosa colaboração.

Ao professor Luís César, pela participação e valiosas contribuições à melhoria do trabalho.

Aos membros do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio, concessão de espaço, materiais e outros.

Ao Rodrigo, pela paciência, carinho, companheirismo, incentivo nessa reta final e sua família, pela acolhida e carinho.

Aos amigos que, de perto ou de longe, me incentivaram e ajudaram em todo momento.

E a todos que colaboraram de alguma forma para a concretização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Fruticultura no Brasil e no mundo	5
3.2. Melão	6
3.3. Micro-organismos presentes nas frutas	6
3.4. Micro-organismos patogênicos associados com frutas.....	7
3.4.1. <i>Listeria spp.</i>	10
3.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	11
3.5. Contaminação cruzada em frutas	14
3.5.1. Contaminação cruzada por <i>L. monocytogenes</i>	16
3.5.2. Quantificação da transferência bacteriana	16
3.6. Sanitização em frutas	17
3.6.1. Métodos de sanitização em alimentos.....	18
3.6.2. Métodos químicos.....	19
3.6.2.1 Compostos clorados	19
3.6.2.2 Compostos não clorados	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Preparação do material biológico e dos reagentes	26
4.1.1. Obtenção das cepas e suspensões bacterianas	26
4.1.2 Preparo das soluções cloradas.....	27
4.2. Estudo da transferência bacteriana de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> durante a etapa de sanitização do melão simulando diferentes processos de contaminação cruzada.....	28
4.2.1. Preparo e padronização dos inóculos.....	28
4.2.2. Preparo das amostras de melão.....	29

4.2.3. Inoculação das amostras	29
4.2.4. Simulação dos processos de contaminação cruzada	30
4.2.5. Avaliação da transferência e permanência bacteriana	32
4.2.6. Análises Estatísticas	34
4.3. Determinação do efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada	34
4.3.1. Preparo das amostras para a quantificação da capacidade de multiplicação	35
4.3.2. Quantificação da capacidade de multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i>	35
5. RESULTADOS	37
5.1. Estudo da transferência bacteriana de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> durante a etapa de sanitização do melão simulando diferentes processos de contaminação cruzada.....	37
5.1.1 Permanência bacteriana nas frutas contaminadas após a etapa de sanitização das frutas	37
5.1.2. Transferência bacteriana para as águas de sanitização e águas de enxague após a etapa de sanitização das frutas.....	39
5.1.3 Transferência bacteriana para os melões não contaminados após a etapa de sanitização das frutas	47
5.2. Determinação do efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada	49
5.2.1 Efeito da estocagem a 12 °C na capacidade de multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada.....	49
5.2.2 Efeito da estocagem a 5 °C na capacidade de multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada.....	50
5.2.3 Efeito da estocagem a 12 °C na capacidade de multiplicação de <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada.....	51
5.2.4. Multiplicação de <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> após a simulação dos processos de contaminação cruzada, corte, embalagem e estocagem sob refrigeração a 5 °C	52
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	54

6.1. Resistência ao cloro das cepas de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. fleischmannii</i> subsp. <i>coloradonensis</i>	54
6.2. Permanência e transferência bacteriana após a simulação dos processos de contaminação cruzada durante a etapa de sanitização	56
6.2.1. Permanência bacteriana nos melões contaminados	56
6.2.2. Transferência para as águas de sanitização e de enxague.....	58
6.2.3. Transferência para os melões não contaminados	60
6.3. Capacidade de multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. fleischmannii</i> subsp. <i>coloradonensis</i> durante a etapa de estocagem sob refrigeração em melão após a simulação da contaminação cruzada, seu corte e embalagem	67
7. CONCLUSÕES.....	72
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais micro-organismos patogênicos associados a surtos de doenças veiculadas por frutas e vegetais. (FAO/WHO, 2008; ABADIAS et al., 2012; RAMOS et al., 2013).....	8
Tabela 2: Surtos associados a <i>L. monocytogenes</i> em diferentes tipos de alimentos.	12
Tabela 3: Permanência de <i>L. monocytogenes</i> no melão após a etapa de sanitização.	38
Tabela 4: Permanência de <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> no melão após da etapa de sanitização.	39
Tabela 5: Transferência de <i>L. monocytogenes</i> log (UFC.ml ⁻¹) para as águas de sanitização e de enxague após a simulação do processo 1 de contaminação cruzada.	40
Tabela 6: Transferência de <i>L. monocytogenes</i> log (UFC.ml ⁻¹) para as águas de sanitização e de enxague após a simulação do processo 2 de contaminação cruzada.	42
Tabela 7: Transferência de <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> log (UFC.ml ⁻¹) para as águas de sanitização e de enxague após a simulação do processo 1 de contaminação cruzada.	45
Tabela 8: Transferência de <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> log (UFC.ml ⁻¹) para as águas de sanitização e de enxague após a simulação do processo 2 de contaminação cruzada.	46
Tabela 9: Transferência de <i>L. monocytogenes</i> para os melões não contaminados após a simulação dos processos de contaminação cruzada.	47
Tabela 10: Transferência de <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> para os melões não contaminados após a simulação dos processos de contaminação cruzada.	49
Tabela 11: Multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> log (UFC.g ⁻¹) a 12 °C e 5 °C após a simulação dos processos de contaminação cruzada.	50

Tabela 12: Multiplicação de <i>L. fleischmannii</i> subsp. <i>coloradonensis</i> log (UFC.g ⁻¹) a 12 °C e 5 °C após a simulação dos processos de contaminação cruzada.....	52
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Surtos reportados de doenças veiculadas por alimentos que foram relacionados com o consumo de frutas. (RAMOS et al., 2013).	10
Figura 2: Etapas de desenvolvimento do processo investigativo.....	26
Figura 3: Descrição das condições experimentais de cada um dos processos de sanitização.....	30
Figura 4: Descrição dos processos de contaminação cruzada.....	31
Figura 5: Permanência de <i>L. monocytogenes</i> (LM) e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> (LF) para o tipo de água empregado em log (UFC.ml ⁻¹) de acordo ao processo de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) simulado durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.....	57
Figura 6: Transferência de <i>L. monocytogenes</i> (LM) e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> (LF) para o tipo de água empregado em log (UFC.ml ⁻¹) de acordo ao processo de contaminação cruzada simulado durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.	59
Figura 7: Transferência de <i>L. monocytogenese</i> <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> após a simulação dos processos de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.....	62
Figura 8: Porcentagens de contaminação de <i>L. monocytogenes</i> (LM) e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> (LF) após a simulação dos processos de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.	64
Figura 9: Taxas máximas e mínimas de transferência obtidas para <i>L. monocytogenes</i> (LM) e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> (LF) após a simulação dos processos de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações. ...	65
Figura 10: Multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> (LM) e <i>L. fleischmannii subsp. coloradonensis</i> (LF) depois do tempo zero (log UFC.g-1) a diferentes temperaturas, após a simulação dos processos de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.....	69

RESUMO

RODRÍGUEZ, Angie Dahiana Duque, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Transferência e multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria fleischmannii subsp. coloradonensis* em melão durante as etapas de sanitização e estocagem sob refrigeração.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Nélcio José de Andrade e Afonso Mota Ramos.

A *Listeria monocytogenes* é um micro-organismo patogênico amplamente distribuído na natureza, isolado de diferentes ambientes, e de uma ampla variedade de alimentos, que são consumidos *in natura*. É uma bactéria de alta importância na indústria de alimentos, uma vez que sobrevive e se multiplica em diferentes condições ambientais, características que lhe permitem superar barreiras impostas durante o processamento de alimentos. Esta bactéria veiculada por alimentos tem sido relacionada a surtos de listerioses, que afeta grupos de maior suscetibilidade e provoca maiores taxas de hospitalização e de mortalidade que outros micro-organismos. Desse modo, a *L. monocytogenes* tem sido reconhecida como um micro-organismo de importância, tanto para as autoridades de saúde pública, como para a indústria de alimentos (CDC, 2013). Na última década, *L. monocytogenes* tem sido responsabilizada por um amplo número de surtos e casos esporádicos, de extensão variada e vinculados com diversos tipos de alimentos (BUCHANAN et al., 2017), entre os quais se destacam os relacionados com melão, ocorridos nos Estados Unidos (2011), Austrália e Canadá (JUNG et al., 2016). O objetivo principal desta pesquisa foi estudar a ocorrência da contaminação cruzada por *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* em melão durante a etapa de sanitização sob diferentes condições experimentais, assim como, determinar o efeito da temperatura de estocagem (5 e 12 °C) na capacidade de multiplicação desses dois micro-organismos, após da ocorrência da contaminação cruzada, corte e embalagem do melão. Para o estudo da contaminação cruzada, as amostras foram inoculadas por imersão com cada um dos micro-organismos estudados separadamente, e incubadas até atingir uma concentração entre 10^6 e 10^8 log (UFC.ml⁻¹). Após ser realizada a simulação dos dois processos de

contaminação cruzada, foi avaliada a transferência bacteriana para a superfície dos melões não contaminados e para as águas de sanitização e de enxague, e a permanência dos micro-organismos na superfície dos melões contaminados. A recuperação dos micro-organismos da superfície dos melões não contaminados demonstrou que apesar destes apresentarem reduções nas populações avaliadas, a transferência bacteriana ocorreu independentemente do processo de contaminação simulado e da concentração da solução sanitizante empregada, obtendo-se resultados para *L. monocytogenes* entre 2,9 e 7,5 log (UFC/fruta) e para *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* entre 4,0 e 7,3 log (UFC/fruta) sem apresentar diferenças significativas entre os micro-organismos avaliados ($p>0,05$). A quantificação da permanência bacteriana nos melões contaminados para *L. monocytogenes* foi de 4,9 a 7,4 log (UFC/fruta). Enquanto a *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* foram de 6,6 a 7,5 log (UFC/fruta), apresentando diferenças significativas entre os micro-organismos avaliados ($p<0,05$). A respeito da transferência dos micro-organismos para as águas de sanitização e as águas de enxague, se evidenciou que independentemente das condições experimentais avaliadas, as transferências obtidas para as águas de enxague foram maiores em comparação às obtidas para as águas de sanitização. O efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação dos micro-organismos estudados, demonstrou que *L. monocytogenes* tem a capacidade de sobreviver e multiplicar-se na polpa do melão nas temperaturas de refrigeração estudadas. Enquanto que para *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* se determinou que tem a capacidade de sobreviver a ambas temperaturas, mas só pode se multiplicar a 12 °C de refrigeração. Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta pesquisa, permitem determinar que o controle eficaz da contaminação durante as diferentes etapas da cadeia produtiva, é muito importante, já que ao se implementar métodos eficientes de sanitização e apropriadas técnicas de manuseio e preparação do alimento, é possível evitar a ocorrência de episódios de contaminação cruzada, que provavelmente ocasionaram surtos de doenças veiculadas por alimentos, representando risco à saúde do consumidor.

ABSTRACT

RODRÍGUEZ, Angie Dahiana Duque, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Transfer and multiplication of *Listeria monocytogenes* and *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* in melon, during sanitization and under refrigeration storage stages.** Advisor: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-advisors: Nélio José de Andrade and Afonso Mota Ramos.

Listeria monocytogenes is a pathogenic microorganism widely distributed in nature, isolated from different environments, as well as from a wide variety of foods that are consumed *in nature*. Is a bacterium of high relevance in the food industry, as it survives and multiplies in different environmental conditions, characteristics that allow it to overcome the barriers imposed during food processing. This bacterium conveyed by food has been linked to outbreaks of listeriosis, which affects groups of greater susceptibility and causes higher rates of hospitalizations and mortality than other microorganisms. Thus, *L. monocytogenes* has been recognized as a relevant microorganism by public health authorities and the food industry (CDC, 2013). During the last decade, *L. monocytogenes* has been responsible for a large number of outbreaks and sporadic cases, of varied extent and related to several types of food (BUCHANAN et al., 2017), among which are those related to melon, reported in the United States (2011), Australia and Canada (JUNG et al., 2016). The main purpose of this research was to investigate the cross-contamination occurrence by *L. monocytogenes* and *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* in melon during sanitization under different experimental conditions; also the research intended to determine the effect of storage temperature (5 and 12° C) on the multiplication capacity of these two microorganisms, after the occurrence of melon cross-contamination, slicing and packaging. For the cross-contamination study, the samples were inoculated by immersion with each of the microorganisms studied separately, and incubated until reaching a concentration between 10^6 and 10^8 (CFU.ml⁻¹). After the simulation of the two cross-contamination processes, it was evaluated the bacterial transfer to the surface of uncontaminated melons and to the sanitizing and rinsing waters,

and the microorganisms permanence on the surface of contaminated melons. The recovery of surface microorganisms from uncontaminated melons demonstrated that even though they present reductions in the evaluated populations, the bacterial transfer occurred, independently of the simulated contamination process and the concentration of sanitizing solution employed, obtaining results for *L. monocytogenes* between 2,9 and 7,5 log (CFU/fruit) and for *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* between 4,0 and 7,3 log (CFU/fruit) without presenting significant differences between the evaluated microorganisms ($p>0.05$). The bacterial permanence quantification in contaminated melons for *L. monocytogenes* was 4,9 to 7,4 log (CFU/fruit). While *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* were 6,6 and 7,5 log (CFU/fruit), presenting significant differences among the evaluated microorganisms ($p<0.05$). Regarding the transfer of microorganisms to sanitizing and rinsing water, it was evident that, independently of the experimental conditions evaluated, the transfers obtained for rinsing waters were higher comparing to those obtained for sanitizing waters. The effect of storage temperature in the multiplication capacity of the studied microorganisms demonstrated that *L. monocytogenes* has the ability to survive and multiply in the melon pulp at the cooling temperatures studied. As for *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*, it has been determined that it has the ability to survive both temperatures but is only able to multiply at 12 °C cooling. The outcomes obtained during this research, allow to determine the relevance of effective contamination control during the different stages of the productive chain, as implementing efficient sanitization methods and appropriate of food handling and preparation techniques, it is possible to avoid the occurrence of cross-contamination episodes which are likely to cause outbreaks of food-borne diseases, thus representing posing a risk to consumer health.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, as doenças de origem alimentar associadas com produtos frescos ou consumidos *in natura* tornaram-se mais comuns e frequentes (EFSA, 2013), pelas quais são um constante desafio de segurança para a indústria de alimentos e para as organizações de saúde pública (APONIENE et al., 2014).

A Organização Mundial da Saúde estima que as doenças associadas com o consumo de alimentos podem causar anualmente a nível mundial, a morte de 2,2 milhões de pessoas (OMS, 2010), sendo os produtos frescos ou consumidos *in natura* considerados como a segunda causa principal de veiculação de micro-organismos patogênicos (APONIENE et al., 2014). Tal conjuntura se deve ao fato de que estes alimentos são frequentemente cultivados em ambientes pouco controlados, estão expostos a diferentes fontes de contaminação, são sanitizados de forma incorreta, recontaminados durante a produção e, ou comercialização, ou mesmo quando são consumidos sem nenhum tipo de tratamento para a redução do risco (PEREZ-RODRIGUEZ et al., 2014).

Na última década, a comercialização de frutas *in natura* tem aumentado significativamente e o principal motivo do crescimento deste mercado é a alta demanda dos consumidores por alimentos frescos, saudáveis, livres de aditivos e prontos para o consumo. Além disso, diferentes organizações (*World Health Organization - WHO, Food and Agricultural Organization – FAO, European Food Safety Authority – EFSA, United States Department of Agriculture – USDA*) recomendam o consumo devido às propriedades nutricionais (compostos bioativos, antioxidantes, fibras, entre outros), além de contribuir para uma dieta equilibrada, reduzir do risco de doenças cardiovasculares ou câncer, permitir a perda de peso de maneira saudável e contribuir na melhoria da qualidade de vida (HERBERT-HERNÁNDEZ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; YAHIA, 2010).

Uma vez que as frutas são consumidas, principalmente, *in natura*, se convertem frequentemente em veículos de diversos micro-organismos patogênicos que estão relacionados a diferentes surtos de doenças veiculadas por alimentos. De acordo aos dados do Centro de Controle e

Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC), uma alta porcentagem de surtos é provocada pelo consumo de frutas (mamão, abacaxi, melão, melancia, nozes entre outras) contaminadas com bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, e *Shigella spp.* (CDC, 2011; LI et al., 2013; RAMOS et al., 2013).

Em alguns países *L. monocytogenes* tem sido responsável por surtos de doenças de origem alimentar, por exemplo, nos Estados Unidos é responsável por aproximadamente 1.591 casos que resultaram em 1.455 hospitalizações e 255 óbitos (SCALLAN et al., 2011). O último surto de amplo impacto reportado e registrado neste país, aconteceu no ano 2011, quando foi rastreado um surto de *L. monocytogenes* em melões inteiros, com 147 casos em 28 estados, causando 33 óbitos e 1 aborto, tornando-o como o surto de origem alimentar mais grave que ocorreu nos últimos 25 anos (CDC, 2012). A Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration* - FDA), investigou o surto, e no relatório final descreveu deficiências relacionadas à higienização dos equipamentos e sanitização das frutas, além de condições de armazenamento não adequadas (CDC, 2012a; FDA, 2011).

Devido à presença de micro-organismos patogênicos nos alimentos, as etapas de higienização e sanitização têm sido destacadas como cruciais na prevenção e diminuição da contaminação, assim como também potenciais responsáveis pela ocorrência da contaminação cruzada durante a cadeia produtiva de alimentos e de acordo com os sistemas de vigilância de saúde pública em diferentes países e com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 25% dos surtos relacionados a doenças veiculadas por alimentos estão estreitamente associados à contaminação cruzada. Portanto, tornou-se não só um problema para a indústria de alimentos, mas também um problema de saúde pública (CARRASCO et al., 2012).

Pelos motivos mencionados anteriormente, numerosas pesquisas são realizadas na tentativa de determinar como ocorre a transferência e prevalência dos micro-organismos patogênicos nas diversas etapas do processamento de alimentos especificamente na etapa de sanitização (MUNTHE et al., 2015). Portanto, estudar os mecanismos da transferência dos micro-organismos e sua potencial multiplicação depois da ocorrência da

transferência, tem como objetivo ajudar a entender, identificar e quantificar os fatores que direta ou indiretamente afetam o desenvolvimento da contaminação cruzada, permitindo assim, desenhar ou desenvolver estratégias de controle que possam ser aplicadas para evitar a permanência, transferência e desenvolvimento de micro-organismos patogênicos nos alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a transferência de *Listeria monocytogenes* e *Listeria fleischmannii subsp. coloradonensis* durante a sanitização do melão e verificar a multiplicação bacteriana durante a estocagem sob refrigeração.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Estudar a transferência e permanência bacteriana de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* durante a etapa de sanitização do melão simulando diferentes processos de contaminação cruzada;
- ✓ Determinar o efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* em melão após a simulação da contaminação cruzada, corte e embalagem.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Fruticultura no Brasil e no mundo

As frutas são alimentos que, normalmente, apresentam altos níveis de compostos bioativos, antioxidantes e fibras, essenciais para uma dieta equilibrada, são apropriadas para melhorar a qualidade de vida e algumas ajudam a perda saudável de peso (HERVERT-HERNÁNDEZ et al., 2011). Devido à presença de nutrientes, compostos fitoquímicos e bioativos, a ingestão é recomendada por muitas organizações da saúde (*World Health Organization - WHO, Food and Agricultural Organization – FAO, European Food Safety Authority – EFSA, United States Department of Agriculture – USDA*) para reduzir o risco de desenvolver doenças como câncer, cardiovasculares entre outras (OLIVEIRA, 2015), o que tem estimulado atualmente uma mudança no estilo de vida dos consumidores e aumentado a demanda de frutas *in natura* (MANDRELL et al., 2006 e PALEKAR et al., 2015).

A produção mundial de frutas é de aproximadamente 587,6 milhões de toneladas anuais. A China lidera o ranking com 19,5% da produção, seguida pela Índia com 11,6% e o Brasil com 6,4%, seguidos por Estados Unidos, Itália, Indonésia, México, Filipinas, Espanha e Turquia. Juntos, estes dez países representaram cerca de 60% da produção mundial de frutas (FAO, 2011).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção de 40 milhões de toneladas ao ano, mas participa com apenas 3% do comércio global do setor, o que demonstra o forte consumo interno (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2014). As frutas que mais contribuem na quantidade total da produção brasileira são laranja, banana, abacaxi, melancia, mamão, melão, que juntos somam aproximadamente 30 milhões de toneladas. De acordo com informações da Pesquisa de Orçamentos Familiares e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística POF/IBGE (2008-2009), há uma tendência para o aumento de consumo de frutas per capita anual em um 28,9% (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2010).

3.2. Melão

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma fruta que pertence à família das cucurbitáceas, esta família inclui várias espécies de plantas cultivadas em todas as regiões tropicais do mundo e é de grande importância econômica como a melancia (*Citrullus lanatus* L.), a abóbora (*Cucurbita maxima* L.), o pepino (*Cucumis sativus* L.) entre outras. O melão é conhecido e consumido em muitos países do mundo, seus principais compostos biologicamente ativos são a vitamina C, a pro-vitamina A, o ácido fólico e alguns compostos fitoquímicos como os compostos fenólicos, que tem uma ampla atividade antioxidante. As concentrações dos compostos biologicamente ativos no melão variam muito e são afetadas pelo genótipo, pelas condições ambientais, como também as condições de produção e manuseio pós-colheita (AMARO et al., 2015).

O Departamento de Agricultura e o Serviço de Pesquisa Econômica dos Estados Unidos relatam que o consumo per capita de melão tem aumentado constantemente na última década (USDA-ERS, 2012), atividade que não parece ser afetada pelos recentes surtos de listerioses reportados neste país (CDC, 2012) e apesar de não ser uma relação causal, o aumento do consumo e da comercialização de produtos *in natura*, tem sido acompanhado por um aumento do número de surtos de doenças veiculadas por alimentos nos últimos anos.

Vários surtos de doenças causadas por diferentes sorotipos de *L. monocytogenes* foram epidemiologicamente relacionados com o melão ao longo dos anos (CDC, 2002 e PALEKAR, 2015). Alguns desses surtos foram determinantes para que a FDA (*Food and Drug Administration*) executasse mais políticas de controle para a importação de melões para os Estados Unidos (FDA, 2011).

3.3. Micro-organismos presentes nas frutas

A microbiota natural das frutas é geralmente do tipo não patogênico para os seres humanos e podem estar presentes no momento do consumo. As diferentes partes das plantas tem diferente morfologia e funções

metabólicas, que, conseqüentemente, fornecem diversos nichos ecológicos para os micro-organismos que posteriormente podem ser transferidos para as frutas.

A presença e número de micro-organismos diferem dependendo do tipo de produto, práticas agrônômicas, área geográfica de produção, e condições meteorológicas antes da colheita. Após a colheita, o transporte, processamento e manuseio dos produtos podem influenciar diretamente a microbiota padrão ou indígena da fruta.

O número e tipo de micro-organismos encontrados em frutas é altamente diverso, por exemplo, podem encontrar-se uma ampla variedade de bactérias, leveduras, fungos e vírus. Entre as bactérias, predominam as bactérias gram-negativas, representando 80 a 90%, o qual é constituído principalmente por espécies do gênero de *Pseudomonas* e *Enterobactérias*. Dentre as bactérias ácido lácticas encontram-se *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus spp.* Muitas destas bactérias ácido lácticas são associadas aos micro-organismos deterioradores e causadores de odores desagradáveis. Também estão presentes algumas espécies de fungos ou bolores dos gêneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus*. Finalmente, as leveduras como *Torulopsis*, *Saccharomyces* e *Candida* fazem parte dominante dos micro-organismos encontrados em frutas por causa do alto teor de açúcares. Quando tais leveduras estão presentes junto a outros fungos podem ocasionar a deterioração, fermentando e amolecendo as frutas (ABADIAS, 2008; CAPONIGRO et al., 2010; DE AZEREDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

3.4. Micro-organismos patogênicos associados com frutas

De acordo com os levantamentos epidemiológicos, as frutas também podem ter micro-organismos patogênicos capazes de causar doenças nos seres humanos, como, por exemplo, bactérias dos gêneros de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* O157: H7; parasitas, protozoários e vírus como se apresenta na Tabela 1. (BUCHHOLZ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Muitos são os fatores que podem contribuir à contaminação das frutas recém-colhidas, por exemplo, a contaminação pré-colheita das frutas pode ocorrer através de animais, fezes, insetos, água, solo, equipamentos, manuseio inadequado, entre outros (SÁNCHEZ et al., 2012). Pela manipulação pós-colheita, através da água de lavagem, trabalhadores, materiais de embalagem, equipamentos de processamento, equipamentos de mobilização e veículos de transporte (OLAIMAT e HOLLEY, 2012).

Além do mencionado anteriormente, durante as etapas de produção ou de comercialização, as frutas podem sofrer alterações físico-químicas e danos mecânicos, já que a superfície da fruta é danificada causando a liberação de substâncias intracelulares, que aumentam a disponibilidade de nutrientes e podem facilitar o crescimento bacteriano e consequentemente, diminuir o prazo de validade do produto (MURIEL-GALET et al., 2013).

Tabela 1: Principais micro-organismos patogênicos associados a surtos de doenças veiculadas por frutas e vegetais. (FAO/WHO, 2008; ABADIAS et al, 2012; RAMOS et al, 2013).

Micro-organismos		Alimentos
Bactérias	<i>Clostridium botulinum</i>	Repolho, pimenta, alho, batata e cenoura.
	<i>E. coli O157:H7</i>	Brotos de alface, couve, aipo, coentro, agrião, alface, repolho, bagas, melões e maçãs para suco.
	<i>L. monocytogenes</i>	Brotos de feijão, couve, chicória, melão, berinjela, alface, batata, rabanete e alface.
	<i>Salmonella spp.</i>	Brotos de alface, alcachofras, folhas de beterraba, aipo, couve, melão, couve-flor, berinjela, escarola, erva-doce, cebola verde, alface, brotos de feijão mungo, agrião mostarda, pimenta, hortaliças para salada, espinafre, suco de frutas não pasteurizado, tomate, melancia, mamey e manga.
	<i>Shigella spp.</i>	Alface, salsa, rabanete, salada legumes e brotos de sementes.
	<i>Staphylococcus spp.</i>	Alface, salsa, rabanete, hortaliças para salada e brotos de sementes.
	<i>Vibrio cholera</i>	Repolho e leite de coco.

	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cenouras, pepinos, alface e tomates
Vírus	Norovirus	Alface, cebolinha, agrião, melão cortado, saladas, tomates em cubos e frutas frescas.
	Hepatitis A	Alface, cebolinha, agrião, framboesas, morangos congelados e bagas.
Protozoários	<i>Cryptosporidium spp.</i>	Alface, cebola, alho e cebolinha.
	<i>Cyclospora spp.</i>	Alface, cebola, cebolinha, framboesas e amoras.

Devido à presença ocasional de bactérias patogênicas em frutas e vegetais, vários surtos associados ao consumo destes produtos têm sido relatados Figura 1. Por exemplo, melões, tomates, peras, melancias, morangos, mangas, uvas, pepino, mamão, espinafre e alface têm sido relacionados com surtos causados por *Salmonella spp.* e *E. coli* O157: H7; e *L. monocytogenes* tem sido relacionada com surtos ligados a alface contaminada, brócolis, rabanete, repolho, batatas, pepinos e melões (CDC, 2011, CDC, 2012; EFSA, 2013).

As informações coletadas de aproximadamente 110 pesquisas desenvolvidas e reportes feitos pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), FDA (*Food and Drug Administration*) e WHO (*World Health Organization*) são apresentados na Figura 1, em que, 1100 dos surtos reportados foram relacionados a diferentes agentes etiológicos classificados da seguinte forma: 53% foram causados por bactérias, 42,5% por vírus e 4,5% por parasitas. Melancia, pepino e mamão foram frutas incluídas no grupo outras frutas (RAMOS et al., 2013).

Portanto, ao obter-se um nível de prevalência de micro-organismos patogênicos em produtos frescos, em especial em frutas, é de importante interesse e preocupação, já que este tipo de alimento é consumido principalmente cru, ou sem nenhum tipo de tratamento de sanitização que assegure inocuidade total, representando assim, um problema potencial de segurança na indústria de alimentos. (CARRASCO et al., 2012; ZWEIFEL e STEPHAN, 2012). Desse modo, métodos de produção seguros e procedimentos de sanitização apropriados são passos críticos e portanto

fundamentais para garantir a segurança de alimentos consumidos *in natura* ou minimamente processados (ARTÉS et al., 2009; RAMOS et al., 2013).

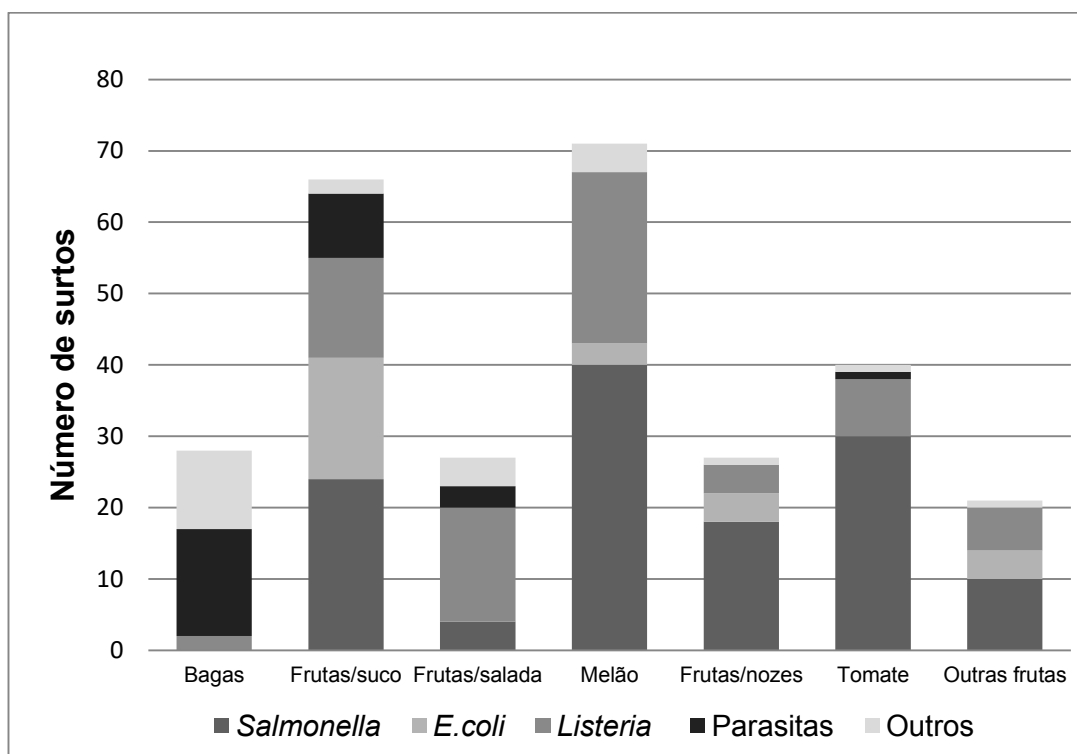


Figura 1: Surtos reportados de doenças veiculadas por alimentos que foram relacionados com o consumo de frutas. (RAMOS et al., 2013).

3.4.1. *Listeria spp.*

Listeria é uma bactéria gram-positiva, não-formadora de esporos e anaeróbica facultativa. O gênero está composto por dez espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria fleischmannii*, e *Listeria weihenstephanensis* (ZHANG et al., 2007; HALTER, NEUHAUS e SCHERER, 2013). As bactérias *Listeria marthii*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria weihenstephanensis* e *Listeria rocourtiae* só recentemente foram descritas como novas espécies no gênero (BERTSCH et al., 2013; GRAVES et al., 2010; LANG HALTER et al., 2013; LECLERCQ et al., 2010).

Por outro lado, a identificação de novas espécies, como *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* que tem implicações na indústria de alimentos é muito

importante, já que a presença dessa bactéria em alimentos poderia estar associada com a presença de *L. monocytogenes* em estes e possivelmente poderia ser empregada como um micro-organismo indicador de contaminação ou substituto no desenvolvimento de outras pesquisas (HENK et al., 2013).

3.4.2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um micro-organismo que se encontra amplamente distribuído na natureza, tendo sido isolado a partir de diferentes fontes, tais como solo, lodo, águas residuais e de uma ampla variedade de alimentos crus e processados. Este micro-organismo é um importante patógeno veiculado por alimentos e pode causar listeriose.

A listeriose é uma das principais doenças relacionadas com alimentos e ocorre geralmente após o consumo de alimentos crus ou minimamente processados e é a principal causa de morte por infecções de origem alimentar, tendo uma taxa de letalidade entre 20% e 30%, sendo uma porcentagem maior em relação às doenças veiculadas por alimentos contaminados por *Salmonella* e *Clostridium botulinum* (BUCHANAN et al., 2017; GAO e LIU, 2014; RAMASWAMY et al., 2007)

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos estima que aproximadamente 1600 casos e 260 mortes ocorrem devido à listeriose anualmente nos Estados Unidos (CDC, 2013; SCALLAN et al., 2011). As doenças clínicas que ocorrem com maior frequência são a septicemia, infecções do sistema nervoso central e infecções materno-fetais em pessoas idosas, mulheres grávidas e indivíduos imunossuprimidos (PERERA et al., 2015) e devido a alta taxa de mortalidade, a listeriose está a nível mundial entre as causas mais frequentes de óbitos causados por doenças veiculadas por alimentos (BARTON e BEHRAVESH et al., 2011; WERBER et al, 2013).

Apesar de *L. monocytogenes* não fazer parte da microbiota natural das frutas, estas podem ser contaminadas com o micro-organismo por meio de fontes ambientais, animais ou humanas, durante sua cultura, colheita,

posterior processamento, falta de sanitização e higienização inadequada, manuseio e transporte (CARPENTIER e CERF, 2011; RAMOS et al., 2013).

No entanto, *L. monocytogenes* por ser um agente patogênico veiculado por alimentos, que pode se desenvolver sob condições que normalmente inibiriam o crescimento de outros tipos de bactérias como baixas temperaturas, elevado teor de sal e condições ácidas, é considerado um micro-organismo problemático para a indústria de alimentos, visto que estas características lhe permitem superar métodos de barreira impostos na indústria de alimentos (PERERA et al., 2015).

L. monocytogenes tem sido vinculada a surtos relacionados com diferentes tipos de alimentos como carnes, frutas, vegetais entre outros. Na última década, os maiores surtos de listerioses relacionados com alimentos ocorreram em vários estados dos Estados Unidos (Tabela 2), por exemplo, em 2011 foi rastreado em 28 estados um surto de *L. monocytogenes* em melões inteiros, que causou 147 casos, 33 óbitos e 1 aborto, pelo qual a Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) investigou o surto, e reportou deficiências relacionadas com a embalagem, condições de armazenamento e higienização. (CDC, 2013; FDA, 2011), assim como também 142 casos por queijos produzidos no México e 108 casos ocasionados pelo consumo de salsichas (CDC, 2013). Também têm sido reportados surtos pelo consumo de tomate, couve e aipo (CARTWRIGHT et al., 2013; GAUL et al., 2013).

Tabela 2: Surtos associados a *L. monocytogenes* em diferentes tipos de alimentos.

Alimento	Lugar e Data	Micro-organismo relacionado	Descrição do surto
Salsão ou aipo cortado (GAUL et al., 2013).	Hospitais de Texas / Estados Unidos 2010.	<i>L. monocytogenes</i>	Um surto com dez casos foi relacionado com máquinas de corte. Afetou a adultos entre os 55 e 80 anos que encontravam-se imunossuprimidos. Provocou o óbito de 5 deles.

Sorvete (CDC, 2015a; CHEN et al., 2016; POUILLOT et al., 2016; RIETBERG et al., 2015).	Estados Unidos 2010 – 2015.	Foram relacionados três sorotipos de <i>L. monocytogenes</i> (1/2b, 3b, 1/2a).	Provocou 2 óbitos. Foi relacionado com o abuso de temperatura.
Melões inteiros (CDC, 2011).	Vários estados dos Estados Unidos 2011.	Foram relacionados cinco sorotipos de <i>L. monocytogenes</i> entre eles encontravam-se 1/2b e 1/2a.	Apresentaram-se 147 casos, dos quais 7 eram gestantes. Ocorreram 33 óbitos e 1 aborto espontâneo.
Brotos de soja mungo (CDC, 2015b).	Estados Unidos 2014.	<i>L. monocytogenes</i>	Um surto com cinco casos. Ocorreram dois óbitos. Inicialmente foi detectada a presença do micro-organismo nos brotos como na água de irrigação mais pesquisas posteriores determinaram a presença no ambiente de produção.
Frutas de caroço (pêssegos inteiros, nectarinas e ameixas). (BUCHANAN et al., 2017).	Califórnia / Estados Unidos 2014.	<i>L. monocytogenes</i>	Um surto com quatro casos. Foi relacionado com a etapa de embalagem.
Maças caramelizadas (CDC, 2015c; GLASS et al., 2015; SALAZAR et al., 2016).	Estados Unidos 2014 - 2015.	<i>L. monocytogenes</i>	Um surto com 35 casos entre os quais 11 foram relacionados com gestantes ou seu recém-nascido. Provocou sete óbitos e um aborto. A bactéria foi isolada tanto da embalagem como da maçã com caramelo. Após foi demonstrado que a inserção da vara na maçã pode ter criado um microambiente local na interface maçã-caramelo que suportou o crescimento bacteriano.

Na União Europeia (UE), 1642 casos confirmados de listerioses foram relatados em 2012 (ANONYMOUS, 2014). O número total de surtos

notificados na UE foi de 0,41 por cada 100.000 habitantes. Na Suíça o número total de surtos notificados anualmente durante os últimos dez anos variaram entre 0,5 e 1,0 por cada 100.000 habitantes. Nos últimos 26 anos, três surtos de listerioses foram registrados na Suíça, incluindo o mais recente relatado em 2011 causado pelo consumo de presunto cozido contaminado (HAECHLER et al., 2013). Um dos últimos surtos de listerioses registrados a nível nacional na Suíça aconteceu entre outubro de 2013 e abril de 2014, 32 surtos de listeriose foram registrados em diferentes lugares do país. O micro-organismo foi veiculado por meio da comercialização de salada pronta para o consumo e a causa da contaminação do produto foi relacionada com um problema no processo de higienização, na fita transportadora do produto (STEPHAN et al., 2015). Há também relatos de surtos de doenças veiculadas por peixes, mexilhões e carne de caranguejo defumada relacionados com *L. monocytogenes* na Suécia, Nova Zelândia e Canadá (FARBER, 2000).

Por ser *L. monocytogenes* um contaminante ambiental, os lugares frios e úmidos nas plantas de processamento de alimentos são propícios para sua presença e desenvolvimento (LIU e SU, 2006), pelo qual reduzir a contaminação desse micro-organismos nas plantas de processamento de alimentos é o meio mais eficaz para evitar a recontaminação e a contaminação cruzada para poder assim, assegurar a qualidade microbiológica dos alimentos que são comercializados (GAO e LIU, 2014).

3.5. Contaminação cruzada em frutas

A contaminação cruzada é frequentemente proposta como um termo geral que se refere à transferência, direta ou indireta de micro-organismos (bactérias, vírus, parasitas) de um produto contaminado a um produto não contaminado. Os processos de transferência bacteriana são considerados uma causa importante de transmissão de doenças veiculadas por alimentos (CARRASCO et al., 2012).

Os sistemas de vigilância de saúde pública estabelecidos em diferentes lugares do mundo tem informado que a contaminação cruzada é um dos principais fatores para o surgimento de surtos de doenças veiculadas por alimentos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde 25% dos surtos

relacionados com alimentos estão associados a eventos de contaminação cruzada e são causados principalmente por bactérias. Os outros surtos estão relacionados com equipamentos contaminados, práticas de higiene precárias, temperaturas de armazenamento inadequadas, cozimento insuficiente, entre outros fatores que tem incidência no crescimento excessivo dos micro-organismos (CDC, 2012). Além disso, vários autores afirmam que a contaminação cruzada causada por micro-organismos patogênicos como bactérias e vírus nos domicílios e restaurantes é também outro fator que contribui no surgimento de surtos de doenças veiculadas por alimentos, podendo ser esporádicos ou epidêmicos (CARRASCO et al., 2012).

A contaminação nas frutas pode ocorrer em vários pontos da produção de alimentos por meio da distribuição, incluindo água de irrigação, solo, colheita, lavagem, sanitização, empacotamento, armazenamento e manipulação pelo consumidor, isto é provavelmente devido à topografia da superfície das frutas, que incentivam a aderência dos micro-organismos e que contêm nutrientes que promovem a multiplicação bacteriana (JENSEN et al., 2015). Por exemplo, durante as etapas de lavagem e sanitização das frutas podem ocorrer com maior frequência eventos de contaminação cruzada, uma vez que as concentrações microbianas em algumas frutas podem aumentar ou número de micro-organismos na água empregada para fazer as lavagens ou quando a concentração do sanitizante não é adequada para reduzir os níveis de carga microbiana (GIL et al., 2009; JENSEN et al., 2015). Pesquisas desenvolvidas anteriormente sugerem que o principal benefício dos agentes sanitizantes é reduzir as taxas de contaminação cruzada que se podem produzir, mantendo a qualidade da água de lavagem. De igual forma, pode reduzir-se rapidamente a eficiência da água de lavagem e dos agentes sanitizantes pela presença de altas cargas orgânicas causadas por sujeira ou produção de detritos (JENSEN et al., 2015; ZHANG et al., 2009;).

Um ponto importante nos estudos de transferência de micro-organismos é que há determinados fatores que ainda são desconhecidos e que podem afetar os resultados da transferência, pelo qual os experimentos que são realizados sob rigoroso controle, permitem estudar e identificar os fatores que influenciam o processo da transferência microbiana. No entanto, estes não explicam os efeitos combinados de alguns fatores como tempo de

contato, superfície de contato, tipo de micro-organismo, concentração do micro-organismo, entre outros (JENSEN et al., 2015).

3.5.1. Contaminação cruzada por *L. monocytogenes*

L. monocytogenes é normalmente encontrada no ambiente e é veiculada aos alimentos através de vários vetores, tais como os seres humanos, animais, equipamentos, matérias-primas e outros materiais, e pode aderir-se à superfície de diferentes materiais que estão em contato direto com os alimentos, tais como aço inoxidável, polietileno e borracha. Vários fatores podem afetar a transferência, como a concentração do agente patogênico, seja na superfície de contato do alimento ou na superfície de contato do equipamento, composição do alimento, tempo, força e velocidade do contato e alguns outros fatores, tais como a temperatura e topografia das superfícies de contato (CHAITIEMWONG et al., 2014).

Em particular, as superfícies em ambientes úmidos e frios podem proporcionar condições favoráveis para a sobrevivência e até mesmo o crescimento do patógeno. A principal via de contaminação de alguns alimentos é provavelmente através das superfícies de contato máquinas de corte, fatiadores e facas que tem sido frequentemente associados com a contaminação de *L. monocytogenes* em carnes, queijo e presunto comercializados ao retalho (HOELZER et al., 2011). Nesse sentido, tem sido estudada a transferência de *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* O157: H7 da superfície de máquinas de corte para diferentes tipos de alimentos (HOELZER et al., 2012).

3.5.2. Quantificação da transferência bacteriana

A quantificação da transferência dos diferentes tipos de micro-organismos, normalmente, é expressada como a taxa de transferência (TR) do agente microbiano avaliado, e é definida como a relação porcentual entre o número de células presentes no alimento contaminado (superfície ou polpa) e o número de células transferidas para o alimento não contaminado (superfície ou polpa), Equação 1, (CHAITIEMWONG et al., 2014).

$$\text{TAXA DE TRANSFERÊNCIA} = \left(\frac{\text{UFC meio não contaminado}}{\text{UFC meio contaminado}} \right) \times 100$$

(Eq.1)

A taxa de transferência pode ser expressa “*per surface units*” (unidade de superfície como por exemplo, cm²) quando uma área amostrada é conhecida, ou “*per fómite*” (número total de micro-organismos recuperados do meio não contaminado após a ocorrência da transferência como por exemplo, melão e maçã) quando a área é desconhecida ou difícil de estimar (CHAITIEMWONG et al., 2014).

Na avaliação quantitativa do risco microbiológico (QMRA), alguns modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para descrever a transferência bacteriana entre as superfícies, vários deles estão baseados em três fatores: uma fonte contaminada, uma fase intermediária (equipamentos, utensílios ou mãos) e, finalmente o alimento. (CHAITIEMWONG et al., 2014; HOELZER et al., 2012).

A aplicação destes modelos de transferência pode ajudar a uma melhor quantificação do impacto da transferência bacteriana no risco final e no desenvolvimento de medidas de controle adequadas para reduzir a contaminação dos alimentos (CHAITIEMWONG et al., 2014).

3.6. Sanitização em frutas

As frutas estão frequentemente em contato com o solo, animais, insetos, ou humanos durante o cultivo e colheita, deste modo, no momento em que são transportadas à planta de processamento ou empacotadora, os produtos mantêm populações entre 10⁴-10⁶ UFC.g⁻¹. Os produtos que são comercializados para consumir *in natura* não recebem um tratamento que possa eliminar todos os micro-organismos presentes no alimento, desse modo, os micro-organismos patogênicos introduzidos em qualquer ponto da cadeia produtiva podem estar presentes no momento do consumo (ABADIAS et al., 2011). Métodos de produção seguros e procedimentos de higienização e sanitização apropriados são passos críticos para garantir a segurança e qualidade dos alimentos (ABADIAS et al., 2011; FAN et al., 2015).

Métodos de limpeza e sanitização de frutas envolvem a aplicação de água, detergentes e tratamentos mecânicos das superfícies por escovas ou *sprays* seguidos por enxágue com água potável e algumas vezes processos de sanitização utilizando produtos químicos. É importante assegurar que a água empregada seja de ótima qualidade para que não se converta num veículo de contaminação e portanto, agentes sanitizantes são muitas vezes utilizados na água de lavagem e de enxágue também, e assim atingir a redução das populações de micro-organismos, possivelmente, presentes nos alimentos, além de minimizar os processos de contaminação cruzada que se posam apresentar (ANTUNES, 2009).

A eficácia do método para reduzir as populações bacterianas vai depender do método de sanitização empregado, tipo e fisiologia dos micro-organismos, características da superfície das frutas, tempo de exposição ao sanitizante, concentração do produto, pH e temperatura. Além disso, a concentração dos produtos químicos ou de outro método empregado é limitado a causa da aceitação sensorial do consumidor (PARISH et al., 2003).

3.6.1. Métodos de sanitização em alimentos

Há uma ampla variedade de métodos usados para reduzir a população de micro-organismos presentes nos produtos frescos inteiros ou cortados, mas o melhor método deveria ser evitar a contaminação sempre que for possível. No entanto, isso nem sempre é possível e o uso de técnicas para reduzir ou eliminar a presença de micro-organismos deterioradores ou patogênicos é de extrema importância para evitar a ocorrência de surtos de doenças veiculadas por alimentos (CORBO et al., 2006; RAMOS et al., 2013).

Existem vários métodos químicos e físicos que de acordo com suas características físico-químicas são mais ou menos eficientes na redução da microbiota indígena, agentes deterioradores ou patogênicos presentes nos alimentos (PARISH et al., 2003, RAMOS et al., 2013). Os métodos químicos de limpeza e de sanitização das superfícies de alimentos geralmente envolvem a aplicação de lavagem mecânica e o uso de sanitizantes, seguido por um enxágue com água potável. Os métodos físicos são eficazes na eliminação de micro-organismos presentes nas superfícies dos equipamentos

ou dos alimentos, utilizando forças de cisalhamento (ALLENDE et al., 2007; GIL et al., 2009; RAMOS et al., 2013).

3.6.2. Métodos químicos

Os compostos químicos disponíveis para realizar a sanitização de frutas e hortaliças são vários, sendo os principais descritos a continuação.

3.6.2.1 Compostos clorados

Os compostos clorados, se caracterizam por ter amplo espectro e alta eficiência no controle da contaminação microbiológica (FAO e WHO, 2008; GAO e LIU, 2014), devem principalmente sua atividade antimicrobiana à formação do ácido hipocloroso (HClO) ao reagir com a água. O HClO é um ácido fraco, não dissociado, altamente oxidante e que pode causar estresse oxidativo e gerar injúrias ou até mesmo a morte dos micro-organismos.

Vários estudos reportam a ação antimicrobiana de agentes sanitizantes à base de cloro com respeito a uma ampla variedade de micro-organismos: bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *L. monocytogenes*; vírus como hepatite A, pólio (tipo 1), rotavírus, adenovírus e calicivírus; helmintos e protozoos como cistos de *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* (DYCHDALA, 2001; GAO E LIU, 2014; OLSZEWSKA et al., 2016). Além disso, é também reportado que a ação sanitizante deste grupo de compostos está determinada ou limitada por sua concentração, tempo de contato, pH e temperatura, entre outros fatores e condições nas quais são empregados.

Esses produtos são classificados como compostos clorados inorgânicos e clorados orgânicos, como mostrado a seguir:

a. Compostos clorados inorgânicos

Os sanitizantes mais comumente utilizados pela indústria de alimentos são compostos à base de cloro e a eficácia destes sanitizantes para

reduzir a população de micro-organismos é de dois ciclos logarítmicos. Sua facilidade de uso e seu custo é relativamente baixo, faz do cloro um sanitizante comumente utilizado na indústria de alimentos. O cloro é usado entre concentrações de 50 – 200 mg.L⁻¹ (LUO et al., 2011; FAN et al., 2015; SHEN et al., 2012), embora estudos recentes apontem que concentrações mais baixas são suficientes para inativar bactérias patogênicas na água e evitar os eventos de contaminação cruzada (FAN et al., 2015; SHEN et al., 2012).

A eficácia antimicrobiana do cloro depende do pH e a quantidade de matéria orgânica presente na água. Em valores de pH acima de 7,5 uma percentagem muito baixa de cloro existe na forma de ácido hipocloroso (HClO), e em valores de pH abaixo de 6,0, existe liberação de gases provavelmente como dicloraminas ou tricloraminas, que podem causar irritações nos trabalhadores. Além disso, o pH baixo pode aumentar a corrosão do equipamento, fazendo desejável a utilização do cloro quando o pH da água é ajustado e mantido em valores de 6,5 – 7,0 e assim, maximizar o nível de HClO e minimizar o efluente gasoso (SHEN et al., 2012; SUSLOW, 2001).

✓ **Hipoclorito de sódio**

O hipoclorito de sódio (NaClO) é um composto biocida eficaz contra uma ampla gama de micro-organismos como: bactérias, fungos, algas e vírus. Em solução aquosa, o hipoclorito de sódio forma o ácido hipocloroso (HClO), o qual é a substância ativa responsável pela ação microbicida. As soluções NaClO a um pH de 6,5 são atualmente as mais utilizadas como sanitizantes na indústria de produtos comercializados *in natura* nos Estados Unidos. Portanto, a manutenção dos níveis adequados e eficientes de cloro nas soluções de lavagem é muito importante para assegurar a qualidade microbiológica dos produtos comercializados (SHEN et al., 2012).

✓ **Dióxido de cloro**

O dióxido de cloro (ClO₂) é empregado como uma tecnologia não térmica promissória para a redução de micro-organismos patogênicos,

utilizado como uma alternativa ao cloro. Frutas e vegetais crus podem ser sanitizados com uma concentração máxima até de 3 mg.L⁻¹, já que tem uma capacidade oxidante de 2.5 vezes maior que outros compostos clorados. Além disso, ClO₂ participa nas reações de cloração e não gera subprodutos nocivos. (KESKINEN, BURKE, & ANNOUS, 2009). Como sanitizante de água potável, é altamente eficaz contra micro-organismos patogênicos, tais como *Legionella*, *Giardia*quistos, *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* e vírus. Para os alimentos sólidos, este método não é tão eficiente pelos baixos níveis de uso que são permitidos. Sendo mais empregado em alimentos líquidos devido a maior capacidade de penetração nos mesmos. Vários estudos demonstraram a eficácia deste gás na descontaminação da superfície de alimentos, em particular contra patógenos como *E. coli* O157: H7 e *L. monocytogenes*. Além disso, tais estudos demonstram que diferentes fatores podem influenciar a letalidade do tratamento com ClO₂, tais como a concentração do gás, tempo de exposição, umidade relativa e temperatura (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2008; RAMOS et al., 2013).

✓ **Clorito de sódio acidificado**

Este composto pode ser utilizado em frutas e vegetais crus como um *spray* ou por imersão em concentrações de mg.L⁻¹. O uso de clorito de sódio acidificado tem demonstrado um efeito antimicrobiano substancial contra *E. coli* O157: H7 e *Salmonella* inoculadas em melões, sub produtos de melão e aspargos.

b. Compostos clorados orgânicos

São conhecidos como cloraminas orgânicas, são produzidas pela reação do ácido hipocloroso com aminas, iminas, amidas e imidas. As mais utilizadas são a cloramina T, a dicloramina T, o diclorodimetil hidantoína, as formas sódicas do ácido dicloroisocianúrico e o ácido tricloroisocianúrico. Esses compostos se apresentam na forma de pó em teores entre 24% a 90% de cloro residual total, expresso em Cl₂. Em comparação com os clorados inorgânicos, liberam mais lentamente o ácido hipocloroso, permanecendo

efetivos por períodos de tempo maiores e são menos reativos com a matéria orgânica. Portanto, formam menos trihalometanos e são mais estáveis ao armazenamento.

✓ **Cloraminas**

As cloraminas são compostos gerados a partir da reação do cloro com amoníaco, estes compostos podem ser classificados como monoclороaminas (NH_2Cl), dicloraminas (NHCl_2) e triclorоaminas (NCl_3) (KIM et al., 2002). O uso dos mesmos em processos de desinfecção tem demonstrado que as monoclорaminas são mais estáveis que o cloro, uma vez que tem demonstrado reduções nos níveis de formação de compostos subprodutos de desinfecção (DBPs) nos processos de sanitização e desinfecção (KRASNER et al., 2013).

✓ **Dicloroisocianurato de sódio.**

O dicloroisocianurato de sódio (NaDCC), também conhecido como diclorо-s-triazinotriona de sódio, é amplamente utilizado para o tratamento de emergência de água, sanitização de superfícies de equipamentos, frutas e hortaliças, já que tem demonstrado ser um agente antimicrobiano eficaz. É um produto aprovado pela USEPA (*Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos*) e OMS (*Organização Mundial da Saúde*) para o tratamento de rotina de água potável (CLASEN e EDMONDSON, 2006). Como outros compostos clorados, produz como agente oxidante o ácido hipocloroso e apresenta certas vantagens sobre NaClO em termos de estabilidade, segurança, baixo custo e fácil manipulação (CLASEN e EDMONDSON, 2006; MACEDO e BARRA, 2002).

3.6.2.2 Compostos não clorados

Outros compostos químicos empregados em processos de sanitização são:

a. Fosfato trissódico (TSP)

Soluções com 15% TSP são eficazes na inativação de micro-organismos como *Salmonella* e *L. monocytogenes* presentes nas superfícies de frutas e vegetais, mostrando reduções decimais de dois ciclos logarítmicos. As soluções que contêm mais do que 15% de TSP podem afetar a qualidade sensorial do alimento. Deve-se notar que o pH de soluções de TSP é de cerca de 11-12, o qual limita sua aplicação comercial como agente sanitizante de alguns tipos de frutas e vegetais (PARISH et al., 2003; RAMOS et al., 2013).

b. Compostos de amônio quaternário.

Os compostos de amônio quaternário são comumente chamados QAC, são surfactantes catiônicos capazes de interagir mais facilmente do que outros sanitizantes com as superfícies de contato de equipamentos ou de alimentos e tem maior atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias gram-positivas como *L. monocytogenes*. Os QAC apresentam algumas vantagens sobre outros sanitizantes, já que não são corrosivos e são estáveis a altas temperaturas e, apesar de não serem aprovados para contato direto com alimentos, podem ser empregados quando o alimento for descascado antes do consumo ou usado para a elaboração de subprodutos. Deve se ter em conta que a eficiência antimicrobiana depende do tipo de amônio quaternário empregado. (PARISH et al., 2003; RAMOS et al., 2013).

c. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos como o ácido láctico, cítrico, acético, ascórbico ou tartárico, são caracterizados como fortes agentes antimicrobianos devido à redução do pH do meio, alteração no transporte e, ou permeabilidade da membrana, acumulação de ânions, redução do pH intracelular (PARISH et al., 2003). Outras atividades celulares afetadas indiretamente são a interferência no transporte de nutrientes, danos na membrana citoplasmática provocando vazamento, mudanças na permeabilidade da membrana e interrupção na sínteses de macromoléculas (INATSU et al., 2005; MILLER et al., 2009). Os

ácidos cítrico e ascórbico são os mais comumente usados na etapa de lavagem e sanitização de frutas e hortaliças, além de ser adicionados em sucos de frutas. (VELAZQUEZ et al., 2009).

d. Ácido peracético

É uma combinação de ácido peracético ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2). É usualmente comercializada como um líquido. Este composto é um forte agente oxidante e é usado nas etapas de lavagem e sanitização de frutas e hortaliças em concentrações de até 80 mg.L^{-1} . Ainda que o ácido peracético seja eficaz na inativação de micro-organismos patogênicos, a ação do mesmo não é suficiente para se obter uma redução total da carga microbiana presente em frutas e hortaliças (ARTÉS et al., 2009; RAMOS et al., 2013; RICO et al., 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Este trabalho de investigação foi desenvolvido em três etapas Figura 2.

PRIMEIRA ETAPA

Preparação do material biológico e dos reagentes

Obtenção das diferentes suspensões bacterianas a ser avaliadas;

Preparação das soluções cloradas em diferentes concentrações e

Preparação da solução de tiosulfato de sódio.

SEGUNDA ETAPA

Avaliação da contaminação cruzada por *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* durante a etapa de sanitização em

Compra da fruta no mercado local;

Lavagem e sanitização das frutas;

Inoculação e incubação de algumas das amostras com o micro-organismo a ser avaliado;

Simulação dos processos de contaminação cruzada durante a etapa de sanitização das frutas;

Avaliação da permanência bacteriana nos melões inoculados;

Avaliação da transferência bacteriana para as águas utilizadas na etapa de sanitização e

Avaliação da transferência bacteriana para os melões não contaminados e sanitizados.

TERCEIRA ETAPA

Determinação do efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*.

Depois da simulação dos processos de contaminação cruzada durante a etapa de sanitização das frutas:

Tirar seis melões e cortá-los em amostras de 300 g $\pm$ 2 g;

Embalagem e refrigeração da metade das amostras a 5 °C e da outra metade a 12 °C e

Avaliação da capacidade de multiplicação bacteriana a 0, 12, 18, 24, 48, e 72 horas de estocagem.

Figura 2: Etapas de desenvolvimento do processo investigativo.

4.1. Preparação do material biológico e dos reagentes

4.1.1. Obtenção das cepas e suspensões bacterianas

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizadas as cepas de *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2b (UFV_2) e *Listeria fleischmannii subsp. coloradonensis* previamente isoladas de melão por Souza (2014), em pesquisas anteriormente efetuadas no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para a realização dos diferentes testes foi necessário multiplicar as cepas bacterianas, para garantir a qualidade e quantidade dos micro-organismos a serem empregados durante a pesquisa.

As suspensões de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* encontravam-se criopreservadas a -85 °C em caldo Infusão Cérebro Coração (Brain Heart Infusion - BHI, Merck®) e glicerol na proporção de 30% (v/v). As diferentes culturas foram descongeladas e alíquotas de 0,1 mL foram ativadas em caldo BHI e incubadas na temperatura de 35°C $\pm$ 2 °C

durante 24 h, após esse tempo, uma alíquota de 0,1 mL das culturas ativas foi novamente transferida para caldo BHI fresco e cultivada nas mesmas condições. Depois as culturas ativas foram estriadas em placas de ágar Oxford (Merck®) suplementado (conforme é indicado pelo fabricante) e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h visando obter UFCs isoladas.

Posteriormente, uma única colônia de cada cepa bacteriana foi transferida a 10 mL de caldo BHI e incubada a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, após uma alíquota de 0,1 mL de cada bactéria foi cultivada e subcultivada em 10 mL de caldo BHI e incubadas $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Finalmente, uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi transferida para tubos *eppendorff* esterilizados e foram centrifugadas a 4°C por 10 min a 5000 g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o resíduo lavado com 1 mL de solução salina esterilizada ao 0,85% (p/v). O procedimento de centrifugação, descarte e lavagem foi realizado duas vezes. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em 700 μL de caldo BHI e 300 μL de glicerol a 80%, e, seguidamente as amostras foram homogeneizadas no vortex e levadas a refrigeração.

4.1.2 Preparo das soluções cloradas

Para a realização dos testes da resistência ao cloro, foram preparadas soluções do sanitizante a partir de dicloroisocianurato de sódio (Nippo-clor), nas concentrações de 150 e 200 mg.L^{-1} de cloro residual total (CRT) expresso em Cl_2 .

A quantificação do princípio ativo nas soluções do sanitizante foi determinada pelo método iodométrico (GREENBER; CLESCERI; EATON, 1992). Este método constitui-se na titulação de uma alíquota de 50 mL da amostra por uma solução padronizada de tiosulfato de sódio, sendo o final da titulação determinado pela viragem de cor azul, proveniente da reação entre amido e iodo, para incolor. Se empregou a Equação 2 para determinar a concentração de cada solução.

$$CRT(Cl_2) = 70,9 * V1 * f_c * V2$$

(Eq. 2)

Em que:

CRT = Cloro Residual Total (mg.L⁻¹)

V1 = volume da solução de Na₂S₂O₃ padronizada gasto na titulação (mL);

f_c = fator de correção da solução de Na₂S₂O₃ padronizada;

V2 = volume da amostra analisada (mL).

O pH final de todas as soluções foi ajustado para 6,5 ± 1, utilizando-se o potenciômetro digital (DM 20, Digimed) previamente calibrado com soluções tampão no pH 4,0 e no pH 7,0.

4.2. Estudo da transferência bacteriana de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* durante a etapa de sanitização do melão simulando diferentes processos de contaminação cruzada

A simulação dos diferentes processos de contaminação cruzada foi realizada em melão. As frutas foram adquiridas no mercado local da cidade de Viçosa-MG, procurando-se escolher frutas sem lesões aparentes e de tamanho semelhante. Posteriormente, as frutas foram levadas ao Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos LHMA/DTA/UFV nas mesmas caixas em que são comercializadas. Seguidamente os melões foram retirados das caixas, lavados com água potável para retirar as sujeiras e finalmente refrigerados até a realização dos experimentos. Nessa etapa do estudo foram utilizados os melões inteiros, com casca, sendo cada fruta uma unidade amostral.

4.2.1. Preparo e padronização dos inóculos

As culturas de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* foram ativadas e subcultivadas em caldo Nutriente (Oxoid®) e incubadas na temperatura de 35°C ± 2°C durante 24 h. Posteriormente, uma

alíquota de 1 mL de cada cultura foi tomada para fazer a determinação da densidade óptica (DO) empregando o espectrofotômetro a um comprimento de onda de 630 nm. As suspensões bacterianas foram ajustadas entre 1,3 e 1,5 de absorbância em caldo Nutriente esterilizado, o que equivale a uma contagem inicial entre 10^6 e 10^8 UFC.mL⁻¹. Seguidamente, foram realizadas diluições decimais seriadas e, alíquotas de 100 µL foram transferidas a placas de ágar Oxford suplementado (conforme é indicado pelo fabricante) e incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 h. Após esse período, enumerou-se as UFCs, quantificou-se e corroborou-se a concentração de cada amostra em UFC.mL⁻¹.

4.2.2. Preparo das amostras de melão

Depois que as frutas foram lavadas com água potável para retirar as sujeiras da superfície e reduzir a carga microbiana inicial, os melões (24 unidades) foram tratados com a solução sanitizante preparada a partir de dicloroisocianurato de sódio (Nippo-clor), na concentração 200 mg.L⁻¹ CRT, por 10 min à temperatura ambiente com um pH próximo ao 6,5. Este processo foi feito com agitação constante para garantir melhor contato das frutas com o sanitizante. Após o tempo de contato, as frutas foram enxaguadas com água potável e água destilada, para retirada total do cloro da superfície das frutas. A ausência de cloro foi atestada com o uso do indicador orto-toluidina em solução ao 0,1% (p/v).

4.2.3. Inoculação das amostras

Após a sanitização das frutas, quatro melões foram selecionados para serem inoculados. Cada melão foi depositado dentro de uma sacola plástica e colocado dentro de um béquer de 2,5 L. Em seguida foram adicionados a cada um deles 500 mL de caldo Nutriente e 15 mL do micro-organismo ativado e subcultivado previamente em caldo Nutriente. Finalmente foram fechados e incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em um período compreendido entre 24 h e 48 h até atingir uma DO entre 1,3 e 1,5 de absorbância a 630 nm, que corresponde a concentração da população bacteriana entre 10^6 - 10^8 UFC.mL⁻¹.

Depois de atingir a concentração do micro-organismo desejada, os quatro melões foram retirados do caldo Nutriente, postos sobre béqueres de 1000 mL e cobertos com sacolas plásticas com a finalidade de deixá-los secar assepticamente e permitir, a fixação dos micro-organismos. O tempo do secagem foi de 2 h à temperatura ambiente. Todos os materiais foram devidamente esterilizados.

4.2.4. Simulação dos processos de contaminação cruzada

Os processos da contaminação cruzada foram desenvolvidos durante a etapa de sanitização das frutas, simulando dos processos de contaminação, utilizando soluções de sanitizante em duas concentrações, com um pH próximo a 6,5 e à temperatura ambiente (150 mg.L⁻¹ de CRT e 200 mg.L⁻¹ de CRT), em melões inoculados com *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* a uma concentração entre 10⁶ e 10⁸ UFC.mL⁻¹. Figura 3.

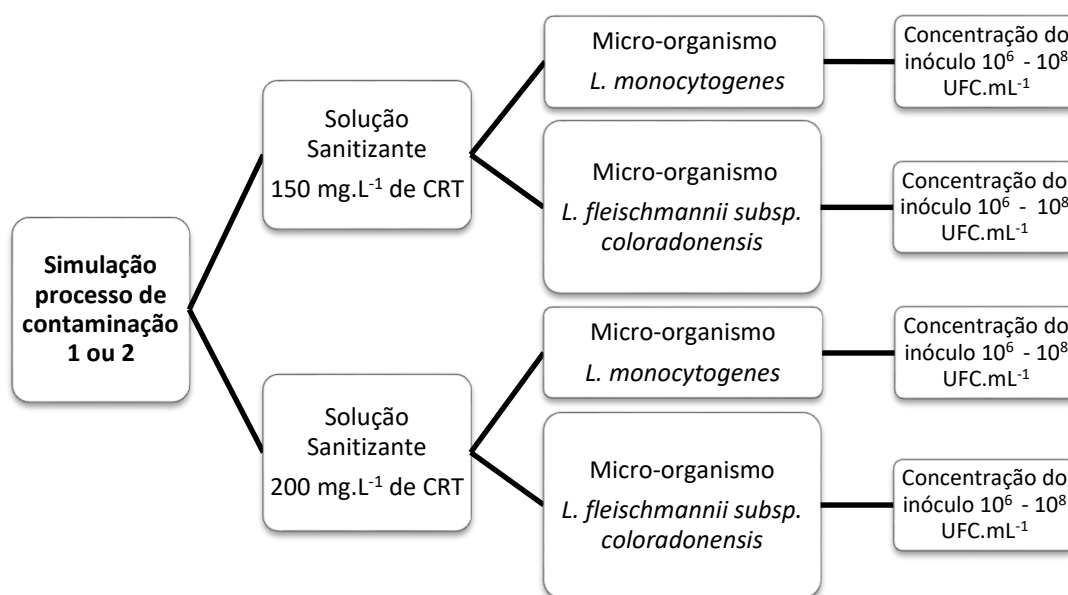


Figura 3: Descrição das condições experimentais de cada um dos processos de sanitização.

Em cada processo utilizou-se 24 amostras, das quais quatro melões foram contaminados (MC) e 20 melões não foram contaminados (MNC). As

amostras foram colocadas no tanque de sanitização de acordo com o processo de contaminação simulado.

O processo 1 consistiu-se na sanitização inicial do total das frutas contaminadas e após completado o tempo, foram sanitizadas no mesmo tanque as demais frutas (não contaminadas).

O processo 2 consistiu-se na colocação da metade das frutas contaminadas no início do processo de sanitização, a seguir foi sanitizada a metade das frutas não contaminadas. Completado o tempo foi sanitizada a outra metade das frutas contaminadas e, finalmente a outra metade das frutas não contaminadas foi sanitizada como observa-se na Figura 4.

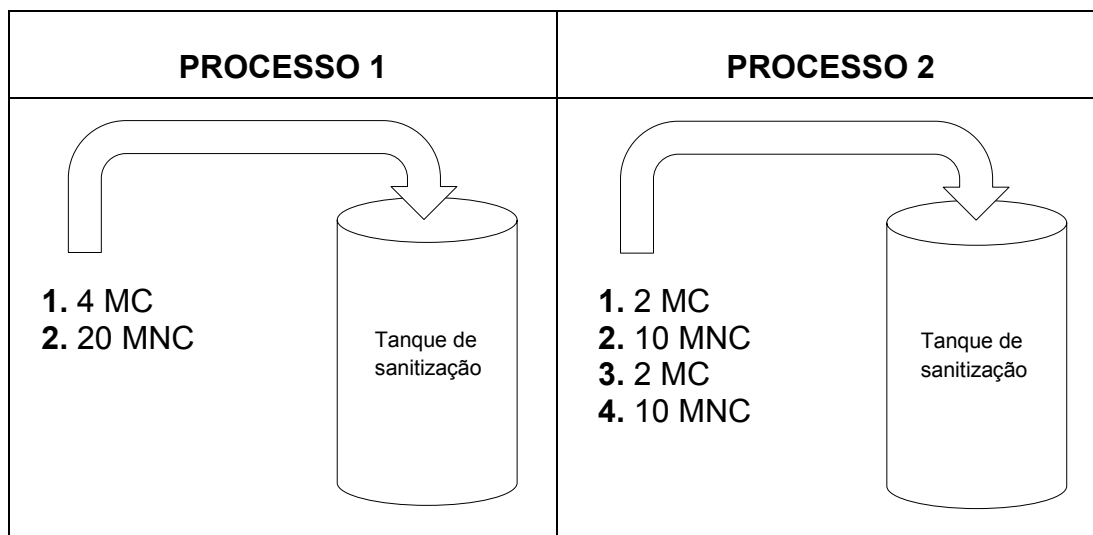


Figura 4: Descrição dos processos de contaminação cruzada.

O tempo de contato de cada uma das amostras com a solução sanitizante foi de 10 min, com o fornecimento de agitação constante para garantir um maior contato da superfície das frutas com a solução clorada. Decorrido o tempo de contato, as frutas foram enxaguadas, primeiramente, com água potável e depois com água destilada, para retirada total do cloro da superfície das frutas e de igual maneira, foi fornecida agitação constante para garantir maior contato da superfície das frutas com as águas de enxague (potável e destilada).

Em cada uma das etapas do processo de sanitização foi usado um tanque específico para evitar a contaminação cruzada e todos foram

preenchidos com 22 L de solução sanitizante ou de águas de enxague (potável e destilada).

4.2.5. Avaliação da transferência e permanência bacteriana

Com a realização destes experimentos procurou-se entender como ocorre a transferência dos micro-organismos da superfície dos melões contaminados para as águas empregadas na etapa de sanitização e para a superfície dos melões não contaminados durante e após do desenvolvimento dos processos de sanitização.

A extensão da contaminação cruzada foi avaliada através da contagem bacteriana em cada uma das amostras (soluções e frutas) durante os diferentes períodos dos experimentos, os quais foram conduzidos em quatro repetições por triplicata.

a. Transferência da superfície das frutas para as águas de sanitização

A transferência dos micro-organismos para os diferentes tipos de amostras de água resultantes durante o processo de sanitização (água de sanitização dos melões contaminados ASMC, água de sanitização dos melões não contaminados ASMNC, água de enxague potável AEP e água de enxague destilada AED) se avaliaram conforme se descreve a continuação.

Das diferentes amostras de água foram tomadas duas alíquotas de 5 mL e transferidas a tubos de ensaio esterilizados. A primeira alíquota foi empregada para determinar a ausência ou a presença de cloro com o indicador de orto-toluidina em solução 0,1% (p/v). Na segunda alíquota, quando a orto-toluidina indicava a presença de cloro foi adicionado 1 mL da solução do neutralizante tiosulfato de sódio 1,5% (p/v), para evitar que ação do cloro continuasse sobre os micro-organismos. Depois de ser homogeneizada a amostra, foi tomada uma alíquota de um 1 mL e transferida a um tubo contendo 9 mL de água peptonada esterilizada 0,1% (p/v) e homogeneizada novamente.

Finalmente foram tomadas três alíquotas de 100 µL e transferidas a placas de ágar Oxford suplementado (conforme é indicado pelo fabricante) e incubadas a 35 °C ± 2 °C, por 24 h. Após esse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) e determinada a concentração de cada amostra em log (UFC.mL⁻¹).

b. Transferência da superfície das frutas contaminadas para a superfície das frutas não contaminadas

Em relação à transferência bacteriana na superfície das frutas, a recuperação das células foi feita da seguinte forma: os melões depois de serem sanitizados foram colocados individualmente em sacolas plásticas e foram lavados sob condições assépticas com 300 mL de água peptonada esterilizada 0,1% (p/v). A lavagem foi feita durante 5 min realizando agitação constante com a finalidade de tirar da superfície do melão o maior número possível de micro-organismos. Ao finalizar o tempo de agitação do melão, foram tomadas duas alíquotas de 5 mL e transferidas a tubos de ensaio esterilizados. A primeira alíquota foi empregada para determinar a ausência de cloro com o indicador de orto-toluidina em solução 0,1% (p/v). Na segunda alíquota, quando a orto-toluidina indicava a presença de cloro foi adicionado 1 mL da solução do neutralizante tiosulfato de sódio 1,5% (p/v), para evitar que ação do cloro continuasse sobre os micro-organismos. Depois de ser homogeneizada, da amostra foi tomada uma alíquota de um 1 mL e transferida a um tubo contendo 9 mL de água peptonada esterilizada 0,1% (p/v) e homogeneizada novamente.

Finalmente, foram tomadas três alíquotas de 100 µL e transferidas a placas de ágar Oxford suplementado (conforme é indicado pelo fabricante) e incubadas a 35 °C ± 2 °C, por 24 h. Após esse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias UFCs e determinada a concentração de cada amostra em log (UFC/fruta).

c. Permanência bacteriana nos melões inoculados

Com a finalidade de compreender o que ocorre com a totalidade da população bacteriana na simulação do processo de contaminação cruzada durante a etapa de sanitização das frutas, decidiu-se avaliar a quantidade de micro-organismos que depois do processo de transferência bacteriana ainda permanecem nas superfícies das frutas inoculadas, realizando a recuperação e quantificação dos micro-organismos dos melões que foram inoculados no início dos processos de sanitização.

O processo de quantificação da permanência bacteriana nos melões contaminados foi feito da mesma forma que a quantificação da transferência bacteriana da superfície das frutas contaminadas para a superfície das frutas não contaminadas descrita no apartado anterior.

4.2.6. Análises Estatísticas

Os valores médios para cada tratamento foram calculados a partir das quatro repetições independentes com amostras em triplicata. A análise estatística foi realizada por análises de variância unidirecional (ANOVA). As médias dos diferentes tratamentos avaliados foram comparadas pelo teste de Tukey e a diferença foi considerada significativa se o valor p for menor que 0,05. Para tanto, foi utilizado o software STATISTICA 7.0.

4.3. Determinação do efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada

A avaliação da capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *Coloradonensis*, desenvolveu-se em amostras nas quais foi simulado o processo de contaminação cruzada durante a etapa de sanitização.

As frutas empregadas para realizar estas provas foram tiradas dos experimentos de simulação de contaminação cruzada feitos anteriormente no item 4.2. As análises foram conduzidas em quatro repetições por triplicata.

4.3.1. Preparo das amostras para a quantificação da capacidade de multiplicação

Após a realização do processo de sanitização, sob condições assépticas, foram tomados seis melões e colocados em sacolas plásticas esterilizadas. Depois, cada melão foi cortado empregando-se uma faca esterilizada em fatias e suas sementes foram removidas. Posteriormente, as fatias foram cortadas em cubos e colocadas em bandejas de isopor até completar 24 amostras de aproximadamente $300\text{ g} \pm 1\text{ g}$, cobertas com filme plástico e refrigeradas da seguinte maneira: 12 amostras na temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, já que é uma temperatura baixa de refrigeração na qual o micro-organismo pode se multiplicar, e 12 amostras na temperatura de $12\text{ }^{\circ}\text{C}$, a qual é a temperatura média de refrigeração alcançada em domicílios e prateleiras de supermercados, simulando assim as condições em que o melão pode ser consumido nos domicílios ou comercializado em restaurantes ou supermercados.

A contagem de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* foi feita em diferentes períodos: no tempo zero, após de terminada a etapa de sanitização, corte e embalagem, e após de completados períodos de 12, 18, 24, 48 e 72 h de refrigeração, uma vez que nem toda a fruta cortada é consumida no mesmo tempo.

4.3.2. Quantificação da capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*

As amostras foram tiradas da refrigeração cada vez que foram completados os tempos de análises e, o conteúdo de cada bandeja foi colocado em uma sacola plástica esterilizada e adicionados 250 mL de água peptonada esterilizada 0,1% (p/v). A amostra foi agitada manualmente e constantemente durante 5 min, com a finalidade de tirar da superfície do

melão o maior número possível de micro-organismos. Após completado o tempo de agitação, foi tomada uma alíquota de 5 mL e transferida a um tubo de ensaio esterilizado. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL foi transferida a um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada esterilizada 0,1% (p/v) e homogeneizada.

Finalmente, foram tomadas três alíquotas de 20 µL da amostra e transferidas em forma de micro-gotas a placas com ágar Oxford suplementado (conforme é indicado pelo fabricante) e incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 h.

Após esse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) determinada a concentração de cada amostra em log (UFC.g^{-1}) e determinada a capacidade de multiplicação de cada micro-organismo nas condições de estocagem avaliadas após a simulação de contaminação cruzada durante a etapa de sanitização.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo da transferência bacteriana de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* durante a etapa de sanitização do melão simulando diferentes processos de contaminação cruzada

Com a finalidade de compreender melhor os mecanismos de transferência bacteriana durante a ocorrência da contaminação cruzada e a distribuição dos micro-organismos estudados, avaliaram-se três fatores: a fonte de contaminação (melões contaminados), a fase intermediária (água de sanitização e águas de exangue) e a matriz ou alimento em que ocorre a distribuição final dos micro-organismos (melões não contaminados), sob diferentes condições experimentais.

5.1.1 Permanência bacteriana nas frutas contaminadas após a etapa de sanitização das frutas

A recuperação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* da superfície do melão contaminado foi avaliada e quantificada como a permanência do micro-organismo.

Os resultados indicaram que a permanência de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* pode ocorrer durante a etapa de sanitização das frutas e que o número de micro-organismos que permaneceram na superfície das frutas contaminadas não foram similares para todas as amostras analisadas, mostrando a possibilidade de que umas amostras permaneceram mais contaminadas que as outras.

a. Permanência de *L. monocytogenes*

Foram analisadas ao todo 64 amostras (melões inteiros, com casca e contaminados inicialmente), distribuídos em quatro tratamentos (16 por cada), sendo analisadas quatro amostras em cada ensaio experimental.

Pelos resultados observou-se que em 93,8% das amostras houve permanência do micro-organismos na superfície da fruta. Os valores da permanência variaram de 4,9 até 7,5 log (UFC/fruta), o valor médio de permanência foi de 6,2 log (UFC/fruta) e a taxa máxima de permanência foi de 93,2% e a taxa mínima de 61,6%.

O tratamento um foi o único que apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) como pode-se observar na Tabela 3.

Tabela 3: Permanência de *L. monocytogenes* no melão após a etapa de sanitização.

Tratamento	Porcentagem permanência (%)	Permanência log (UFC/fruta)	Média da permanência log (UFC/fruta)	Taxa máxima permanência (%)	Taxa mínima permanência (%)
1 P1 CS150 mg.L ⁻¹	100	5,1 - 7,2	6,2 ± 0,5 ¹ a	89,7	63,9
2 P1 CS200 mg.L ⁻¹	100	5,0 - 7,3	6,6 ± 0,7 ¹ ab	90,7	62,5
3 P2 CS150 mg.L ⁻¹	75	6,6 - 7,3	6,9 ± 0,3 ² b	91,5	82,9
4 P2 CS200 mg.L ⁻¹	100	6,5 - 7,5	7,0 ± 0,3 ³ b	93,2	81,3

P1 - processo 1 de contaminação, P2 – processo 2 de contaminação e CS - concentração do sanitizante. ¹ Média de 16 amostras em triplicata seguida do desvio padrão. ² Média de 10 amostras em triplicata seguida do desvio padrão. ³ Média de 14 amostras em triplicata seguida do desvio padrão. Comparação de médias feita entre linhas e colunas. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

b. Permanência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*

Para comparar os índices de permanência obtidos de *L. monocytogenes* durante a simulação dos processos de contaminação cruzada, decidiu conduzir aleatoriamente apenas dois tratamentos empregando *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* na superfície dos melões contaminados.

A respeito dos resultados obtidos determinou-se que a permanência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* ocorreu em 100% das amostras avaliadas e encontram-se valores entre 6,6 e 7,5 log (UFC/fruta), o valor médio de permanência bacteriana foi de 7,2 log (UFC/fruta), a taxa máxima de permanência foi de 93,6% e a taxa mínima de 83%. Os resultados por tratamento são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Permanência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* no melão após da etapa de sanitização.

Tratamento	Porcentagem permanência	Permanência log (UFC/fruta)	Média da permanência log (UFC/fruta)	Taxa máxima permanência (%)	Taxa mínima permanência (%)
1 P1 CS200 mg.L ⁻¹	100	6,7 - 7,2	7,0 ± 0,2 a	90,3	83,8
2 P2 CS150 mg.L ⁻¹	100	6,6 - 7,5	7,2 ± 0,3 a	93,6	83,1

P1 - processo 1 de contaminação, P2 – processo 2 de contaminação e CS - concentração do sanitizante. Média de 8 amostras em triplicata seguida do desvio padrão. Comparação de médias feita entre linhas e colunas. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p>0,05).

5.1.2. Transferência bacteriana para as águas de sanitização e águas de enxague após a etapa de sanitização das frutas

Neste trabalho, foram empregadas como fases intermediárias três tipos de águas: a primeira foi a solução sanitizante (solução de dicloroisocianurato de sódio), que foi avaliada em momentos diferentes e classificada como: ASMC (água de sanitização melões contaminados) e ASMNC (água de sanitização melões no contaminados), a segunda fase intermediária foi a água potável, classificada como AEP (água de enxague potável) e a terceira fase intermediária foi a água destilada, classificada como AED (água de enxague destilada).

A recuperação de *L. monocytogenes* ou de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* nos diferentes tipos de fases intermediárias representou a

transferência dos micro-organismos para as águas de sanitização e/ou enxague respectivamente.

Os resultados indicaram que a transferência bacteriana para as águas empregadas, pode ocorrer durante a etapa de sanitização das frutas e que o número de micro-organismos que foram transferidos são não similares entre as amostras analisadas, mostrando assim, a possibilidade que umas amostras fossem mais contaminadas que outras.

a. Transferência de *L. monocytogenes* para as águas de sanitização e enxague após a simulação do processo 1 de contaminação cruzada

Ao todo foram analisadas 32 amostras de água, distribuídas em dois tratamentos (16 por cada), e divididas em quatro tipos de amostras: ASMC, ASMNC, AEP e AED, as quais foram avaliadas em cada ensaio experimental.

Os resultados demonstram que em 75% das amostras analisadas detectou-se a presença de *L. monocytogenes*. Os valores de transferência variaram entre 0,5 e 4,3 log (UFC.ml⁻¹), o valor médio da transferência foi de 2,1 log (UFC.ml⁻¹), a taxa máxima da transferência foi de 54,2% e a taxa mínima de 5,6%.

Os resultados obtidos para cada um dos tipos de água avaliados por tratamento são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Transferência de *L. monocytogenes* log (UFC.ml⁻¹) para as águas de sanitização e de enxague após a simulação do processo 1 de contaminação cruzada.

Processo 1		
Amostra de Água	Concentração do sanitizante	
	150 mg.L ⁻¹	200 mg.L ⁻¹
ASMC	0,6 ± 1,0 a	2, 8 ± 1,2 abc
ASMNC	0,6 ± 1,2 a	1,2 ± 1,5 ab
AEP	1,7 ± 0,6 abc	2,2 ± 1,5 abc

AED	3,7 ± 0,7 bc	3,9 ± 0,5 c
------------	---------------------	--------------------

Média de 4 amostras em triplicata seguida do desvio padrão. ASMC (água de sanitização melões contaminados), ASMNC (água de sanitização melões não contaminados), AEP (água de enxágue potável), AED (água de enxágue destilada). Comparação de médias feita entre linhas e colunas. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

✓ **Tratamento 1: *L. monocytogenes* - Processo 1 de contaminação –
Nível de concentração do sanitizante 150 mg.L⁻¹**

Os resultados obtidos indicaram que 68,6% das amostras avaliadas neste tratamento apresentaram transferência bacteriana. Durante a quantificação foram determinados valores entre 0,5 e 4,1 log (UFC.ml⁻¹) e o valor médio de transferência foi de 1,6 log (UFC.ml⁻¹). A taxa máxima de transferência foi de 51,1% e a taxa mínima de 6%.

Com relação a cada tipo de água avaliada observou-se que as taxas mais baixas de transferência foram para as águas de sanitização ASMC e ASMNC com valores de 8,1% e 7,3% respectivamente e a taxa mais alta foi determinada para a AED correspondente a 42,1%.

✓ **Tratamento 2: *L. monocytogenes*- Processo 1 de contaminação –
Nível de concentração do sanitizante 200 mg.L⁻¹**

Sob estas condições de estudo, os resultados mostraram que 81,3% das amostras de água avaliadas apresentaram transferência de *L. monocytogenes*. Entre os dados obtidos observaram-se valores entre 1,477 e 4,3 log (UFC.ml⁻¹), o valor médio da transferência do micro-organismo foi de 2,6 log (UFC.ml⁻¹), a taxa máxima de transferência foi de 54,2% e a taxa mínima, de 18,4%.

De acordo com os tipos de amostras de água avaliadas, determinou-se que a taxa mais baixa de transferência foi para a ASMNC, correspondente a 14,3% e a taxa mais alta foi de 48,5%, para AED.

Entretanto, observa-se na Tabela 5, que entre os diferentes tipos de amostras analisadas nos diferentes tratamentos avaliados apresentaram diferenças significativas no análises de variância ($p<0,05$).

b. Transferência de *L. monocytogenes* para as águas de sanitização e enxague após a simulação do processo 2 de contaminação

Para este estudo, foram analisadas no total 48 amostras de água, distribuídas em dois tratamentos (24 por cada) e divididas em seis tipos de amostras: ASMC, que foi avaliada em dois momentos diferentes e classificada como: ASMC1 (água de sanitização da metade dos melões contaminados) e ASMC2 (água de sanitização da outra metade dos melões contaminados), ASMNC que foi avaliada em dois momentos diferentes e classificada como: ASMNC1 (água de sanitização da metade dos melões não contaminados) e ASMNC2 (água de sanitização da outra metade dos melões não contaminados), AEP e AED, que foram avaliadas em cada ensaio experimental.

Após a quantificação e avaliação dos dados obtidos determinou-se que 58,3% das amostras apresentaram transferência bacteriana. Determinou-se valores entre 1,5 e 4,2 log (UFC.ml⁻¹), o valor médio de transferência foi de 1,5 log (UFC.ml⁻¹), a taxa máxima de transferência foi de 52,9% e a taxa mínima de 18,5%.

Com relação aos dois tratamentos avaliados, os resultados obtidos (Tabela 6) são apresentados a seguir:

Tabela 6: Transferência de *L. monocytogenes* log (UFC.ml⁻¹) para as águas de sanitização e de enxague após a simulação do processo 2 de contaminação cruzada.

Processo 2		
Amostra de água	Concentração do sanitizante	
	150 mg.L ⁻¹	200 mg.L ⁻¹
ASMC1	0,6 ± 1,1 ab	2,0 ± 1,5 abc
ASMNC1	1,0 ± 1,9 abc	1,2 ± 1,5 abc
ASMC2	0,4 ± 0,7 ab	2,2 ± 1,6 abc
ASMNC2	0,0 ± 0,0 b	3,1 ± 1,0 ac

AEP	0,8 ± 1,0 ab	1,8 ± 1,2 abc
AED	3,7 ± 0,6 c	3,0 ± 0,6 ac

Média de 4 amostras em triplicada seguida do desvio padrão. ASMC1 (água de sanitização da metade dos melões contaminados), ASMNC1 (água de sanitização da metade dos melões não contaminados), ASMC2 (água de sanitização da outra metade dos melões contaminados), ASMNC2 (água de sanitização da outra metade dos melões não contaminados), AEP (água potável de enxágue), AED (água destilada de enxágue). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

✓ **Tratamento 1: *L. monocytogenes* - Processo 2 de contaminação –
Nível de concentração do sanitizante 150 mg.L⁻¹**

Os resultados obtidos sob estas condições de estudo mostraram que 37,5% das amostras apresentaram transferência bacteriana. Durante a quantificação foram determinados valores entre 1,4 e 4,2 log (UFC.ml⁻¹), o valor médio de transferência foi de 1,1 log (UFC.ml⁻¹), a taxa máxima de transferência foi de 52,9% e a taxa mínima de 18,5%.

Com relação a cada tipo de água avaliada observou-se que: para a ASMNC2 não ocorreu transferência bacteriana e que as taxas mais baixas de transferência foram para ASMC1 e ASMC2 com porcentagens de 6,9% e 4,6% receptivamente, e a taxa mais alta foi de 46,8% para a AED.

✓ **Tratamento 2: *L. monocytogenes*- Processo 2 de contaminação –
Nível de concentração do sanitizante 200 mg.L⁻¹**

Sob estas condições de estudo, os resultados mostraram que 79,2% das amostras de água avaliadas apresentaram transferência de *L. monocytogenes*. Entre os dados obtidos observaram-se valores entre 1,8 e 4,2 log (UFC.ml⁻¹), o valor médio da transferência do micro-organismo foi de 2,2 log (UFC.ml⁻¹), a taxa máxima de transferência foi de 52,1% e a taxa mínima de 23,1%.

De acordo com os tipos de amostras de água avaliadas, determinou-se que a taxa mais baixa de transferência foi para ASMNC1 correspondente a 15,3% e as taxas mais altas foram para as amostras ASMNC2 e AED com uma porcentagem de 38,5% e 37,9%, respectivamente.

Entretanto, observa-se na Tabela 6, que entre os diferentes tipos de amostras analisadas nos diferentes tratamentos avaliados apresentaram diferenças significativas nas análises de variância ($p < 0,05$).

c. Transferência de *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* para as águas de sanitização e enxague após a simulação do processo 1 de contaminação cruzada

Para comparar os índices de transferência obtidos de *L. monocytogenes* para os diferentes tipos de águas empregadas durante a simulação dos processos de contaminação cruzada, decidiu conduzir aleatoriamente apenas dois tratamentos empregando *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis*.

As análises foram realizadas no total de 8 amostras, divididas em um só tratamento e distribuídas em quatro tipos de amostras: ASMC, ASMNC, AEP e AED, as quais foram analisadas em cada ensaio experimental.

Na avaliação da transferência de *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* encontrou-se que 50% das amostras apresentou transferência bacteriana, já que está só ocorreu em dois dos tipos água avaliada AEP e AED. Os resultados para cada um dos tipos de água avaliados no tratamento desenvolvido são apresentados na Tabela 7.

A transferência bacteriana variou entre 2,0 e 4,6 log (UFC.ml⁻¹) e o valor médio foi de 1,7 log (UFC/ml⁻¹). As amostras da AED mostraram a taxa máxima de transferência 57,8% e as amostras da AEP a taxa mínima de transferência 25%.

Entretanto observa-se na Tabela 7, que entre os diferentes tipos de amostras analisadas no tratamento avaliado apresentaram diferenças significativas nas análises de variância ($p < 0,05$).

Tabela 7: Transferência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* log (UFC.ml⁻¹) para as águas de sanitização e de enxague após a simulação do processo 1 de contaminação cruzada.

Processo 1	
Água de sanitização	Concentração do sanitizante
	200 mg.L ⁻¹
ASMC	0,0 ± 0,0 a
ASMNC	0,0 ± 0,0 a
AEP	2,1 ± 0,1 b
AED	4,6 ± 0,14 c

Média de duas amostras em triplicata seguida do desvio padrão. ASMC (água de sanitização melões contaminados), ASMNC (água de sanitização melões não contaminados), AEP (água de enxágue potável), AED (água de enxague destilada). Comparação de médias feita entre linhas e colunas. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p>0,05).

d. Transferência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* para as fases intermediárias após a simulação do processo 2 de contaminação cruzada

No total foram avaliadas 12 amostras, divididas em um só tratamento e distribuídas em seis tipos de amostras: ASMC1, ASMC2, ASMNC1, ASMNC2, AEP e AED, as quais foram avaliadas em cada ensaio experimental.

Durante o estudo sob estas condições de estudo, encontrou-se que 58,3% das amostras apresentaram transferência bacteriana, determinaram-se valores de transferência entre 1,7 e 5,0 log (UFC.ml⁻¹), o valor médio de transferência foi de 1,7 log (UFC.ml⁻¹), a taxa máxima de transferência foi de 62,5% e a taxa mínima de 21,2%.

Os resultados para cada um dos tipos de água avaliados no tratamento desenvolvido são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Transferência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* log (UFC.ml⁻¹) para as águas de sanitização e de enxague após a simulação do processo 2 de contaminação cruzada.

Processo 2	
Água de sanitização	Concentração do sanitizante
	150 mg.L ⁻¹
ASMC1	2,3 ± 0,9 ab
ASMNC1	1,3 ± 1,8 ab
ASMC2	0,0 ± 0,0 a
ASMNC2	0,8 ± 1,2 ab
AEP	5,0 ± 0,0 b
AED	1,0 ± 1,4ab

Média de duas amostras em triplicata seguida do desvio padrão. ASMC1 (água de sanitização da metade dos melões contaminados), ASMNC1 (água de sanitização da metade dos melões não contaminados), ASMC2 (água de sanitização da outra metade dos melões contaminados), ASMNC2 (água de sanitização da outra metade dos melões não contaminados), AEP (água potável de enxágue), AED (água destilada de enxágue). Comparação de médias feita entre linhas e colunas. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

De acordo com os tipos de amostras de água avaliadas, determinou-se que foi evidenciada a ausência total da transferência bacteriana para as amostras da ASMC2. As taxas mais baixas de transferência foram determinadas para ASMNC2 (10,6%) e para as amostras da AED (12,5%). A taxa mais alta de transferência correspondeu as amostras da AEP com uma porcentagem de 62,5%.

Entretanto, observa-se na Tabela 8, que entre os diferentes tipos de amostras analisadas no tratamento avaliado apresentaram-se diferenças significativas nas análises de variância ($p<0,05$).

5.1.3 Transferência bacteriana para os melões não contaminados após a etapa de sanitização das frutas

Os resultados indicaram que a transferência de *L. monocytogenes* ou de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* desde a superfície das frutas contaminadas (melões contaminados - MC) para a superfície das frutas não contaminadas (melões não contaminados - MNC) pode ocorrer durante a etapa de sanitização das frutas. Além disso, a transferência não foi similar para todas as amostras analisadas, já que de acordo com os dados obtidos, evidenciou-se que umas amostras foram mais contaminadas que outras.

a. Transferência de *L. monocytogenes* para os melões não contaminados

Para a avaliação da transferência de *L. monocytogenes* foram analisadas no total 224 amostras (melões inteiros, com casca e não contaminados inicialmente), distribuídas em quatro tratamentos (56 amostras por cada), sendo analisadas 14 amostras em cada ensaio experimental. Durante a avaliação e quantificação da transferência bacteriana, encontrou-se que em 95,98% das amostras ocorreu a contaminação dos melões não contaminados, obtiveram-se valores que variaram entre 3,0 a 7,5 log (UFC/fruta), o valor médio da transferência foi de 6,1 log (UFC/fruta), a taxa máxima de transferência foi de 93,4% e a taxa mínima de 36,9%.

Na Tabela 9 observa-se os dados encontrados para cada um dos tratamentos avaliados.

Tabela 9: Transferência de *L. monocytogenes* para os melões não contaminados após a simulação dos processos de contaminação cruzada.

Tratamento	Porcentagem transferência	Transferência log (UFC/fruta)	Média da transferência log (UFC/fruta)	Taxa máxima transferência (%)	Taxa mínima transferência (%)
1 P1 CS150 mg.L ⁻¹	96,4	3,0 - 7,5	6,1 ± 1,6 ^{1 a}	93,4	36,9

2 P1 CS200 mg.L ⁻¹	98,2	4,0 - 7,3	6,3± 1,1 ² a	90,1	50,0
3 P2 CS150 mg.L ⁻¹	96,4	6,0 - 7,4	6,3 ± 1,6 ³ a	92,3	75,6
4 P2 CS200 mg.L ⁻¹	92,9	4,0 - 7,3	5,8 1,8 ⁴ a	91,8	50,0

P1 - processo 1 de contaminação, P2 – processo 2 de contaminação e CS - concentração do sanitizante. ¹ Média de 46 amostras em triplicata seguida do desvio padrão, ² Média de 48 amostras em triplicata seguida do desvio padrão, ³ Média de 36 amostras em triplicata seguida do desvio padrão e ⁴ Média de 56 amostras em triplicata seguida do desvio padrão. Comparação de médias feita entre linhas e colunas. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p>0,05).

No tratamento um foi obtida a taxa mais alta e a taxa mais baixa de transferência de *L. monocytogenes* de todos os tratamentos desenvolvidos.

b. Transferência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* para os melões não contaminados

Para comparar os índices de transferência obtidos de *L. monocytogenes* para a superfície dos melões não contaminados durante a simulação dos processos de contaminação cruzada, decidiu conduzir aleatoriamente apenas dois tratamentos empregando *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*.

A avaliação da transferência do micro-organismo foi realizada no total de 28 amostras (melões inteiros, com casca e não contaminados inicialmente), distribuídos em dois tratamentos (14 por cada), sendo analisadas 14 amostras em cada ensaio experimental.

Nos dados obtidos, encontrou-se que em 100% das amostras ocorreu a transferência bacteriana, determinaram-se valores entre 4,0 e 7,4 log (UFC/fruta), o valor médio de transferência foi de 6,3 log (UFC/fruta), a taxa máxima de transferência foi de 92% e a taxa mínima de 50%.

Como se pode observar na Tabela 10, são apresentados os resultados dos tratamentos avaliados.

Tabela 10: Transferência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* para os melões não contaminados após a simulação dos processos de contaminação cruzada.

Tratamento	Porcentagem transferência	Transferência log (UFC/fruta)	Média da transferência log (UFC/fruta)	Taxa máxima transferência (%)	Taxa mínima transferência (%)
1 P1 CS200 mg.L ⁻¹	100	5,9 - 7,4	5,6± 1,0 ¹ a	92,0	73,7
2 P2 CS150 mg.L ⁻¹	100	4,0 e 6,9	6,7 ± 0,5 ² b	86,1	50,0

P1 - processo 1 de contaminação, P2 – processo 2 de contaminação e CS - concentração do sanitizante. ¹ Média de 12 amostras em triplicata seguida do desvio padrão, ² Média de 10 amostras em triplicata seguida do desvio padrão. Comparação de médias feito entre linhas e colunas. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p>0,05).

5.2. Determinação do efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada

5.2.1 Efeito da estocagem a 12 °C na capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada

O estudo da capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* sob estas condições foi realizado no total de 192 amostras divididas em quatro tratamentos (48 por cada), sendo analisadas 12 amostras em cada ensaio experimental.

Os dados obtidos amostraram que em 97,9% das amostras ocorreu a contaminação pelo micro-organismo estudado. Determinou-se valores de crescimento entre 1,2 e 5,1 log (UFC.g⁻¹) e o valor médio foi de 3,7 log (UFC.g⁻¹). Para cada um dos tratamentos avaliados os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Multiplicação de *L. monocytogenes* log (UFC.g⁻¹) a 12 °C e 5 °C após a simulação dos processos de contaminação cruzada.

Tempo (h)	12 °C				5 °C			
	Processo 1		Processo 2		Processo 1		Processo 2	
	CS1	CS2	CS1	CS2	CS1	CS2	CS1	CS2
0	2,4 ± 0,8	2,8 ± 0,6	2,1 ± 1,6	3,7 ± 1,4	1,7 ± 1,6	2,9 ± 0,7	1,7 ± 1,2	4,0 ± 0,7
12	2,8 ± 2,0	3,0 ± 1,3	3,3 ± 1,4	3,7 ± 1,6	2,4 ± 1,9	3,7 ± 0,4	2,7 ± 1,0	4,1 ± 0,5
18	3,3 ± 1,3	3,7 ± 0,9	3,5 ± 1,1	4,3 ± 0,1	3,2 ± 0,4	3,8 ± 0,3	3,3 ± 0,4	4,2 ± 0,5
24	4,1 ± 0,7	4,5 ± 0,2	2,4 ± 0,5	4,6 ± 0,4	3,1 ± 0,6	4,2 ± 0,7	2,5 ± 0,9	4,3 ± 0,5
48	4,8 ± 0,1 ¹	4,6 ± 0,2 ¹	3,7 ± 1,5	4,7 ± 0,5 ²	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,9	1,6 ± 1,8	4,0 ± 0,3
72	5,0 ± 0,0 [*]	4,4 ± 0,4 ¹	4,3 ± 0,3 ²	4,7 ± 0,1 ²	3,7 ± 0,4	3,8 ± 0,5	3,2 ± 1,1	4,2 ± 0,4

Média de 8 amostras em triplicata seguida do desvio padrão, ¹ Média de 4 amostras em triplicata seguida do desvio padrão, ² Média de 6 amostras em triplicata seguida do padrão.

Observa-se pelos resultados, que independentemente do processo de contaminação simulado e a concentração de sanitizante utilizado, todas as amostras contaminadas com *L. monocytogenes* e refrigeradas a 12 °C apresentaram multiplicação bacteriana. O crescimento do micro-organismo nas amostras avaliadas entre as 48 e 72 h mostrou um aumento entre 0,997 e 2,265 ciclos logarítmicos.

5.2.2 Efeito da estocagem a 5 °C na capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada

A avaliação da multiplicação de *L. monocytogenes* a 5°C foi realizada em 192 amostras, divididas em quatro tratamentos (48 por cada), sendo analisadas 12 amostras em cada ensaio experimental.

Em 94,5% das amostras ocorreu a contaminação pelo micro-organismo estudado. Determinou-se contagens microbianas entre 1,6 e 4,1 log (UFC.g⁻¹)

¹⁾ e o valor médio foi de 3,3 log (UFC.g⁻¹). Para cada um dos tratamentos avaliados, os resultados são apresentados na Tabela 11.

Observa-se nos resultados obtidos, que independentemente do processo de contaminação simulado e a concentração de sanitizante utilizada, todas as amostras contaminadas com *L. monocytogenes* e refrigeradas a 5 °C apresentaram multiplicação bacteriana. O crescimento do micro-organismo nas amostras avaliadas entre as 18 e 72 h mostraram um aumento entre 0,3 e 2,0 ciclos logarítmicos, sendo este aumento menor quando comparado com os dados obtidos a 12°C.

5.2.3 Efeito da estocagem a 12 °C na capacidade de multiplicação de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* no melão cortado e embalado após a simulação da contaminação cruzada

Para comparar os resultados obtidos do efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* no melão fatiado e embalado após a simulação dos processos de contaminação cruzada, decidiu conduzir aleatoriamente apenas quatro tratamentos empregando *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*.

Nessa etapa do estudo, foram analisadas no total 48 amostras, divididas em dois tratamentos (24 por cada), sendo analisadas 12 amostras em cada ensaio experimental.

Observou-se que em 100% das amostras ocorreu a contaminação pelo micro-organismo estudado. Determinou-se valores de crescimento entre 3,0 e 5,0 log (UFC.g⁻¹) e o valor médio de multiplicação bacteriana foi de 4,2 log (UFC.g⁻¹). Para cada um dos tratamentos avaliados os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Multiplicação de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* log (UFC.g⁻¹) a 12 °C e 5 °C após a simulação dos processos de contaminação cruzada.

Tempo (h)	12 °C		5°C	
	Processo 1	Processo 2	Processo 1	Processo 2
	200 mg.L ⁻¹	150 mg.L ⁻¹	200 mg.L ⁻¹	150 mg.L ⁻¹
0	4,0 ± 0,0	4,5 ± 1,1	4,6 ± 0,5	4,0 ± 0,0
12	4,5 ± 0,3	*	4,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
18	3,7 ± 2,1	*	4,7 ± 0,1	2,3 ± 0,9
24	4,6 ± 0,0	*	4,0 ± 0,0	2,2 ± 0,3
48	4,2 ± 0,2	*	4,2 ± 1,1	0,0 ± 0,0
72	4,0 ± 0,0	*	2,4 ± 1,1	4,7 ± 0,2

Média de 4 amostras em triplicata seguida do desvio padrão. *Amostras com contagens maiores a 10⁵ log (UFC.g⁻¹).

Observa-se nos resultados da Tabela 12 que houve apenas aumento da população microbiana nas amostras associadas com o processo 2 (150 mg.L⁻¹) em no mínimo 0,5 ciclos logarítmicos.

5.2.4. Multiplicação de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* após a simulação dos processos de contaminação cruzada, corte, embalagem e estocagem sob refrigeração a 5 °C

A avaliação foi realizada no total de 48 amostras, divididas em dois tratamentos (24 por cada), sendo analisadas 12 amostras em cada ensaio experimental.

Os resultados obtidos demonstram que 83,3% das amostras analisadas foram contaminadas pelo micro-organismo estudado. Determinou-se, valores de crescimento entre 1,6 e 5,0 log (UFC.g⁻¹) e o valor médio foi de 3,1 log (UFC.g⁻¹).

Observa-se pela Tabela 12 que para ambos processos não houve aumento da população microbiana após o período total de incubação. Os dados indicam redução da população inicial detectada no tempo zero. Dessa forma, é possível concluir que este micro-organismo não possui capacidade de multiplicação nestas condições de estudo.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. Resistência ao cloro das cepas de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*

Diferentes autores têm reportado a similaridade entre a ação antimicrobiana entre o dicloroisocianurato de sódio, o hipoclorito de sódio e outros sanitizantes a base de cloro, indicando que a única diferença é o doador do cloro (CDC, 2005). Da mesma forma, a atividade antimicrobiana depende de fatores como a concentração e tempo de contato (CLASEN e EDMONDSON, 2006).

Na indústria de alimentos, normalmente empregam-se soluções cloradas para a sanitização de frutas, hortaliças e produtos frescos cortados, em concentrações que variam de 50 mg.L⁻¹ a 200 mg.L⁻¹ e com tempos de contato que variam entre 5 e 10 min de acordo com o produto (RICO et al., 2007, RAMOS et al., 2013). Diferentes estudos desenvolvidos têm demonstrado que a sanitização com soluções à base de cloro pode diminuir a carga bacteriana em valores que variam desde 1,0 log (UFC.g⁻¹) até 3,2 log (UFC.g⁻¹), dependendo do método de inoculação, concentração de cloro, tempo de contato e bactérias alvo (BAUR et al., 2005, BELTRÁN et al., 2005b, CASTEEL et al., 2008; HUA e RECKHOW, 2007; RAMOS et al., 2013).

Os resultados obtidos demonstram que ainda o sanitizante seja um produto a base de cloro e se caracterize por ser uma substância fortemente oxidante, as células bacterianas podem neutralizar a ação, acionando respostas ao estresse oxidativo e sistemas enzimáticos antioxidantes. Essas respostas desempenham um papel importante na sobrevivência do micro-organismo, quando é exposto a algum tipo de sanitizante clorado como o hipoclorito de sódio, as cloraminas, espécies reativas de oxigênio, entre outros.

Estudos têm demonstrado que duas das enzimas responsáveis pelas respostas dos micro-organismos ao estresse oxidativo são a catalase e a superóxido dismutase, já que ambas as enzimas podem ser induzidas nas células bacterianas para proteger o material genético e componentes celulares importantes para a sobrevivência bacteriana, uma vez que

trabalham sinergicamente no controle de substâncias oxidantes (AZIZOGLU e KATHARIOU 2010; MONGKOLSUK e HELMANN, 2002).

No entanto, as substâncias oxidantes podem ter diversos efeitos na atividade antioxidante das enzimas catalase e superóxido dismutase das diferentes bactérias, entre estas as pertencentes ao gênero *Listeria spp.* (FISHER et al., 2000). A atividade destas enzimas foram avaliadas em diferentes sorotipos de *L. monocytogenes* antes e após de sua adaptação a soluções sanitizantes a base de cloro (hipoclorito de sódio, cloramina-T), indicando que as atividades tanto da catalase como da superóxido dismutase variam muito entre as populações estudadas antes de sua adaptação aos sanitizantes, e que ambas atividades aumentaram significativamente em todos os sorotipos após apresentarem adaptação, sugerindo que os sistemas antioxidantes em *L. monocytogenes* conformados por estas duas enzimas, desempenham papéis importantes na proteção das células quando expostas a estresse severo causado por sanitizantes clorados em concentrações subletais (GAO e LIU, 2014).

Da mesma forma, um dos mecanismos reguladores mais importantes que permite a sobrevivência dos micro-organismos em condições adversas é o fator sigma alternativo (σ^B), o qual é codificado pelo gene *rpoS*. O fator σ^B regula a expressão de um amplo grupo de genes que respondem a vários tipos de estresse entre estes o oxidativo, ácido, osmótico, entre outros (NYSTRÖM, 2004; ALLEN et al., 2016). Várias pesquisas têm relacionado o fator σ^B com a sobrevivência de *L. monocytogenes* a diversos tipos de controle na indústria de alimentos, como por exemplo a resistência ao estresse oxidativo provocado por alguns sanitizantes (dodecilsulfato de sódio, benzalcônio cloreto de cetilpiridínio, hipoclorito de sódio, entre outros) tem sido relacionada com a atividade do fator σ^B (ALLEN et al., 2016; RYAN et al., 2008; VAN DER VEEN e ABEE, 2010).

6.2. Permanência e transferência bacteriana após a simulação dos processos de contaminação cruzada durante a etapa de sanitização

6.2.1. Permanência bacteriana nos melões contaminados

Os resultados obtidos na avaliação da permanência dos micro-organismos avaliados na superfície dos melões contaminados após da etapa de sanitização foram consideravelmente elevados em comparação com os dados obtidos da transferência bacteriana tanto para as águas de sanitização e de enxague como para os melões não contaminados inicialmente.

De acordo com pesquisas desenvolvidas, a ineficácia para eliminar as células microbianas aderidas na superfície de frutas e hortaliças, é atribuída à incapacidade das soluções aquosas para molhar a superfície hidrofóbica da cutícula cerosa, além de que, algumas vezes apresentam a inativação de seu princípio ativo pela presença de matéria orgânica (CARRASCO et al., 2008). Da mesma forma, a presença de biofilmes nas superfícies dos alimentos também reduz a eficácia do cloro contra os micro-organismos (CARRASCO et al., 2008; DE AZEREDO et al., 2011).

Nos resultados obtidos da quantificação da permanência bacteriana nos melões contaminados após da realização da sanitização, encontraram-se valores para cada um dos micro-organismos avaliados assim: para *L. monocytogenes* determinaram-se valores entre 4,9 log (UFC/fruta) e 7,5 log (UFC/fruta) e para *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* determinaram-se valores entre 6,7 log (UFC/fruta) e 7,5 log (UFC/fruta). Na Figura 5, pode-se observar os valores médios da permanência bacteriana obtidos para cada um dos tratamentos avaliados.

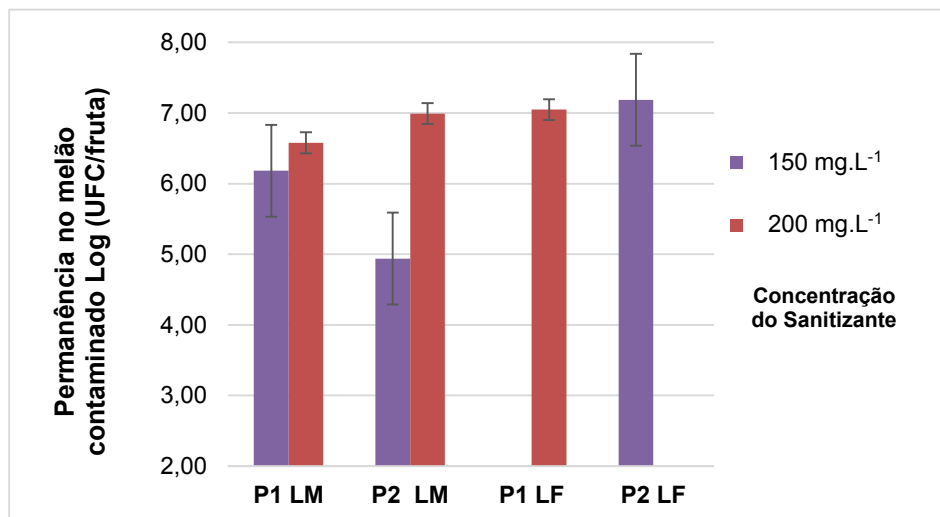


Figura 5: Permanência de *L. monocytogenes* (LM) e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* (LF) para o tipo de água empregado em log (UFC.ml⁻¹) de acordo ao processo de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) simulado durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.

Com relação à permanência de *L. monocytogenes*, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os processos de contaminação simulados e a concentração da solução sanitizante empregada. Já para *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*, não foram determinadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as condições experimentais avaliadas.

Com relação aos dois micro-organismos avaliados, só foi determinada diferença significativa ($p < 0,05$) para o tratamento em que foi avaliada a transferência de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* na simulação do processo 2, empregando-se a solução clorada a 150 mg.L⁻¹ uma vez que a recuperação do micro-organismo foi a maior apresentada durante todo o estudo.

O método de inoculação empregado (imersão) é um método muito eficiente, pois assegura o contato dos micro-organismo com a superfície da fruta a ser contaminada. Lang et al., (2014) compararam diferentes métodos de inoculação (imersão, gotas e aerossol) de *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella spp.* em alface e salsão. Os autores indicaram que o maior número de micro-organismos foram recuperados em amostras inoculadas pelo método de imersão. Este método facilita a filtração dos micro-organismos em

toda a superfície da alface incluindo suas bordas, enquanto que os outros métodos diminuem a distribuição das células tanto em na superfície da alface como em suas bordas, e ainda que o método de goteio proporcione maior controle sobre o volume inoculado do que os métodos de imersão ou aerossol, não se obtém contato com toda a superfície e bordas das amostras, já no caso do método do aerossol nem a distribuição e volume de amostra pode-se padronizar eficientemente.

Da mesma forma o tempo de secagem (2 h) das amostras depois de serem inoculadas, para permitir a adesão das células bacterianas em sua superfície, foi um tempo adequado para garantir o número de micro-organismo presentes nas frutas inoculadas e, poder assim, realizar uma recuperação e quantificação eficiente da permanência e transferência bacteriana nos diferentes tipos de águas empregadas durante a etapa de sanitização como também nos melões não contaminados e contaminados após etapa da sanitização.

Em pesquisas em que foram testados diferentes tempos de secagem das amostras de alface (2 e 24 h) depois de ser inoculadas com *L. monocytogenes* por imersão, foi demonstrado que o tempo de secagem após terminada sua inoculação teve pouco ou nenhum efeito na viabilidade e recuperação dos micro-organismos da superfície da alface, já que ao comparar-se os resultados obtidos dos diferentes tempos, não foram obtidas diferenças significativas (LANG et al., 2004; LIN et al., 2000).

6.2.2. Transferência para as águas de sanitização e de enxague

Nos resultados obtidos da quantificação da transferência bacteriana para as águas de enxague (potável e destilada) foram maiores em comparação aos obtidos nas águas de sanitização, independentemente do processo de contaminação simulado, da concentração da solução sanitizante e do micro-organismos avaliado, como pode-se observar na Figura 6.

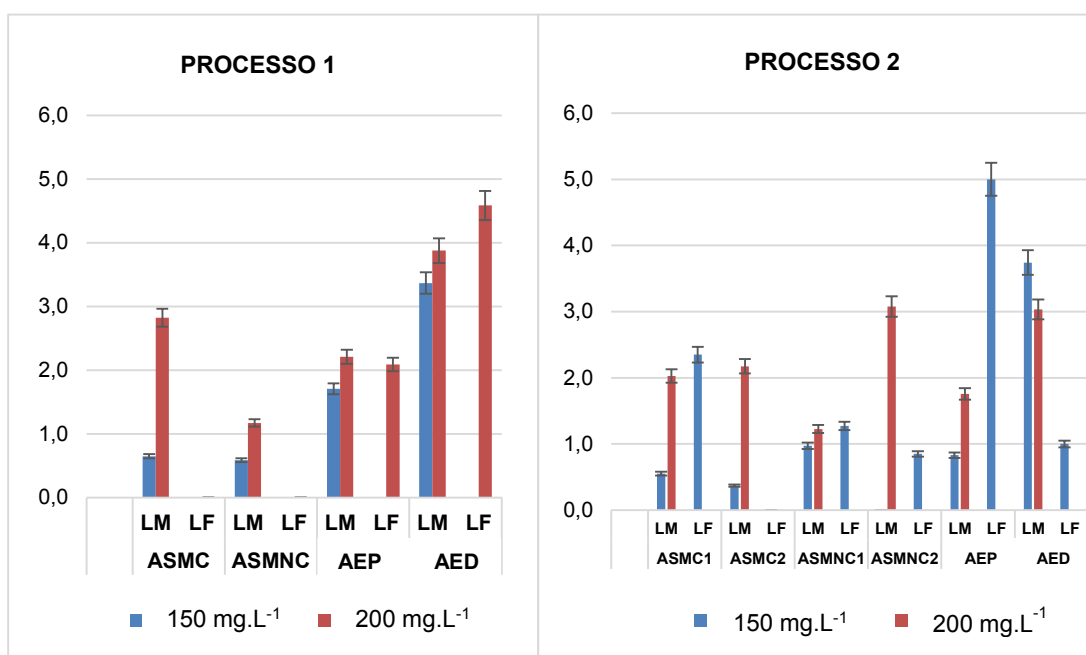


Figura 6: Transferência de *L. monocytogenes* (LM) e *L. fleishmanniisubsp. coloradonensis* (LF) para o tipo de água empregado em log (UFC.ml⁻¹) de acordo ao processo de contaminação cruzada simulado durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.

Resultados similares foram obtidos por Lang et al., (2004), quando o número de células de *L. monocytogenes* recuperadas após da lavagem com água não clorada de amostras de alface e salsão foram maiores do que o número de microrganismos recuperados das amostras de água clorada.

É possível que a baixa recuperação bacteriana na água clorada seja devido ao emprego do Ágar Oxford com suplemento seletivo, o qual não tem a capacidade de recuperar as células injuriadas pelo efeito oxidante do sanitizante.

É reconhecido que as bactérias podem encontrar-se em estado injuriado como resultado à exposição a diferentes tratamentos de controle como: aquecimento, refrigeração, sanitização, entre outros. As células injuriadas podem-se reparar e recuperar seu potencial patogênico, sem embargo, estas células injuriadas ou lesadas não podem ser recuperadas em meios de cultura seletivos, que são frequentemente empregados nas metodologias de detecção e recuperação de micro-organismos, e pelo qual também, é importante considerar a recuperação deste tipo de células, para

poder assim quantificar com maior eficiência o efeito dos processos de controle empregados na indústria de alimentos.

Em pesquisas realizadas anteriormente, foram empregadas micro-organismos patogênicos resistentes ao ácido nalidíxico, para poder realizar sua recuperação em meios de cultura não seletivos suplementados com ácido nalidíxico para que não apresente interferência na quantificação pela presença de outros micro-organismos presentes nas amostras avaliadas, da mesma forma, os meios de cultura não seletivos, permitem a recuperação das células bacterianas injuriadas pela exposição a solução clorada em maior quantidade em comparação com os meios de cultura seletivos, como foi demonstrado por Lang et al., (2004) no estudo da recuperação de *L. monocytogenes* nas amostras de água clorada após da etapa de sanitização de alface e salsa e nos estudos de Jung et al., (2016) ao quantificar a contaminação cruzada por *L. monocytogenes* em melões inteiros após do processo de sanitização.

6.2.3. Transferência para os melões não contaminados

Os episódios de contaminação cruzada em melão podem-se apresentar em qualquer etapa da cadeia produtiva, já que ao ser uma fruta que cresce no solo, está quase sempre em contato com a terra e com as águas de escoamento pluviais, pelo qual pode ser contaminado por um amplo número de micro-organismos deterioradores ou patogênicos. Além disso, durante as etapas de colheita e pós-colheita também é suscetível a ser contaminado por proporcionar um ambiente favorável tanto para a adesão dos micro-organismos pela estrutura de sua superfície, como para sua sobrevivência e crescimento devido a suas características físico-químicas (JUNG et al., 2016).

Entre as etapas do processamento de alimentos, uma das etapas que se converte em um ambiente propício para a ocorrência de episódios de contaminação cruzada é a etapa de sanitização, uma vez que é uma operação que envolve vários fatores que podem facilitar sua ocorrência e ter um alto impacto na dinâmica da transferência bacteriana como: a água, o sanitizante empregado e sua concentração, o tempo de exposição ao sanitizante, o tipo

de alimento, a estrutura superficial da fonte de contaminação, estado fisiológico do micro-organismo e sua possível resistência ao sanitizante (HOELZER et al., 2012; SILVA et al., 2008; VORST et al., 2006).

Os resultados obtidos sobre a contaminação cruzada por *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* durante a etapa de sanitização dos melões não contaminados, demonstraram que a transferência bacteriana ocorreu na maioria das amostras avaliadas independentemente do processo de contaminação simulado, concentração do sanitizante empregado e micro-organismo avaliado, ainda que, ocorreram reduções nas populações durante a etapa de sanitização.

Da mesma forma, a transferência bacteriana não foi similar para todas as amostras analisadas, provavelmente devido ao fato de que mesmo estas serem selecionadas com um tamanho e peso aproximadamente semelhantes e ausência de danos na sua superfície, não eram todas do mesmo peso e tamanho, além de que apresentavam diferenças entre elas por irregularidades em suas superfícies como maior ou menor rugosidade.

Ukuku et al., (2001) relataram também variabilidade nas contagens dos micro-organismos recuperados da superfície de amostras de melão e atribuíram a diferença entre os dados devido às irregularidades superficiais do melão como rugosidade e fendas. A ocorrência da contaminação cruzada durante a etapa de sanitização pode ser evidenciada pela recuperação dos micro-organismos estudados da superfície dos melões não contaminados. A quantificação da transferência bacteriana independentemente do processo de contaminação simulado e da concentração da solução sanitizante empregada mostrou valores para *L. monocytogenes* entre 3,0 log (UFC/fruta) e 7,5 log (UFC/fruta) e para *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* entre 4,0 log (UFC/fruta) e 7,4 log (UFC/fruta). Na Figura 7, pode-se observar os valores das transferências obtidos para cada um dos tratamentos avaliados.

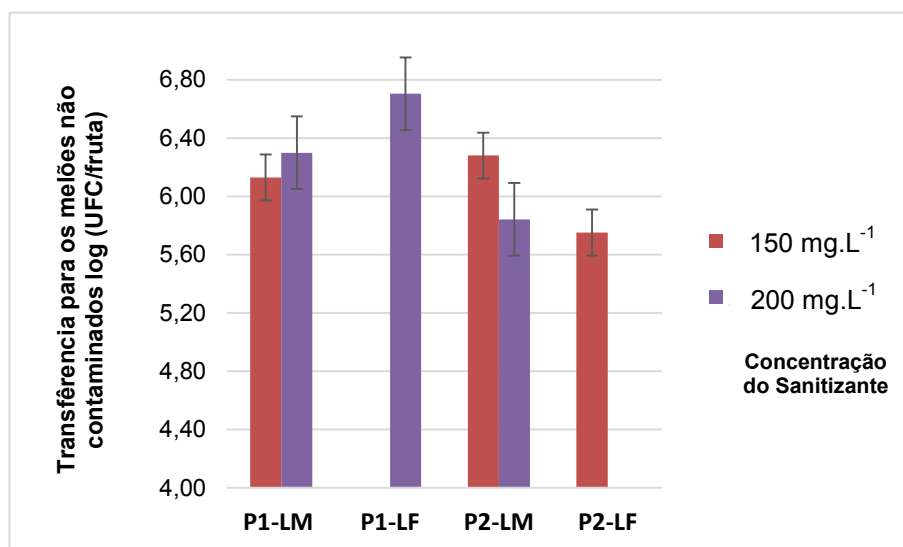


Figura 7: Transferência de *L. monocytogenes* e *L. fleischmanni* subsp. *coloradonensis* após a simulação dos processos de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.

De acordo com pesquisas realizadas sobre a contaminação cruzada de *L. monocytogenes* em melões inteiros após de serem sanitizados, foi possível evidenciar a transferência bacteriana para a superfície dos melões não contaminados entre 1,0 e 2,7 log UFC/cm², (JUNG et al., 2016). Outro estudo realizado por Ukuku et al., (2015), determinou valores de transferências que variaram desde 3,0 a 3,5 log (UFC.g⁻¹)

Estudos de contaminação cruzada por *L. monocytogenes* em alimentos que são fatiados (salame, presunto de porco, presunto de peru entre outros) evidenciaram coeficientes de transferências entre 0,3 a 5,0 log (HOELZER et al., 2012). Da mesma forma após do fatiamento de cebolas com um nível inicial de inoculação de ~8.6 log (UFC/cebola) para cebolas não contaminadas encontraram valores de transferência entre 6,7 e 2,7 log (UFC/cebola) (SCOLLON et al., 2016). Em carne de boi e de porco moída foram relatados valores mínimos de transferências entre 0,5 e 1,6 log (UFC/porção) e valores máximos entre 3,0 e 4,9 log (UFC/porção) (MØLLER et al., 2016).

Pesquisas realizadas sobre a contaminação cruzada por diferentes bactérias incluindo a *L. monocytogenes*, demonstram que a transferência

bacteriana está fortemente relacionada à capacidade de sobrevivência do micro-organismo nas superfícies de contato envolvidas, seja da fruta, área de processamento ou utensílio (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; TODD et al., 2009). Também tem sido demonstrado, que as bactérias são capazes de permanecer ativas durante horas ou até mesmo dias após de serem transferidas a uma nova superfície através de água contaminada, mãos, bancadas, cortadoras, entre outras (CRITZER e DOYLE, 2010; GORMLEY et al., 2010; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). Da mesma forma, a transferência bacteriana também pode ser influenciada pelas características favoráveis dos micro-organismos para aderir-se à superfície da fruta e o número inicial de micro-organismos envolvidos no episódio de contaminação (GIL et al., 2009; VELÁZQUEZ et al., 2009).

Com relação à transferência de *L. monocytogenes*, não foram determinadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os processos de contaminação simulados e a concentração da solução sanitizante empregada. Já para *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis*, foram determinadas diferenças significativas ($p<0,05$) entre as condições experimentais avaliadas.

Com relação aos dois micro-organismos estudados não foram determinadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos avaliados.

A porcentagem de amostras que foram contaminadas durante a etapa de sanitização por *L. monocytogenes* foi de 95,98% e para *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* de 100%, respectivamente. Independentemente do processo de contaminação simulado, da concentração do sanitizante e do micro-organismo estudado, as porcentagens de contaminação quantificadas foram sempre superiores a 90% em todos os tratamentos avaliados como pode-se observar na Figura 8.

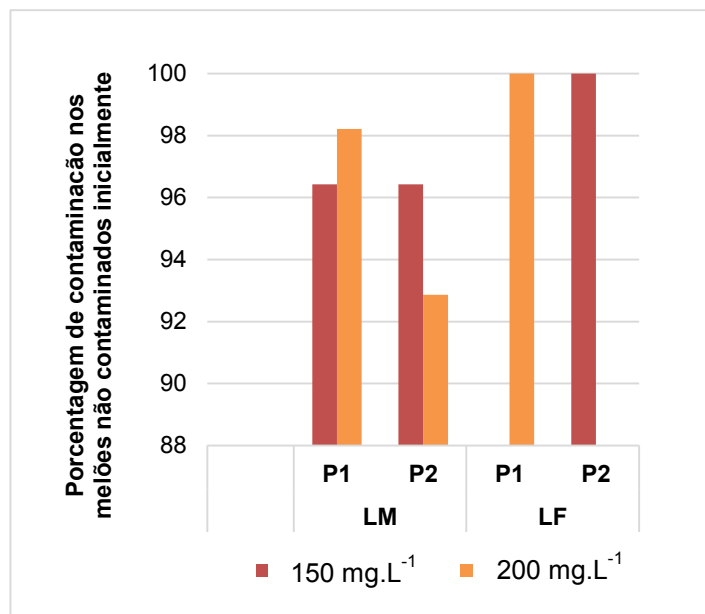


Figura 8: Porcentagens de contaminação de *L. monocytogenes* (LM) e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* (LF) após a simulação dos processos de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.

Valores reportados na literatura por Jung et al., (2016) no estudo da contaminação cruzada por *L. monocytogenes* em melões inteiros e cortados após de sua sanitização, indicaram porcentagens de contaminação entre 50% e 100% para os melões inteiros, e de entre 33,3% e 83,3% para os melões cortados.

As taxas de transferência bacteriana durante a simulação dos processos de contaminação cruzada obtidas (Figura 9) apresentaram-se da seguinte forma para cada micro-organismo avaliado: para *L. monocytogenes* a taxa máxima de transferência encontrou-se entre 90% e 94% e a taxa mínima entre 35% e 76%. Com respeito a *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*, a taxa máxima de transferência encontrou-se entre 85% e 92% e a taxa mínima entre 50% e 74%.

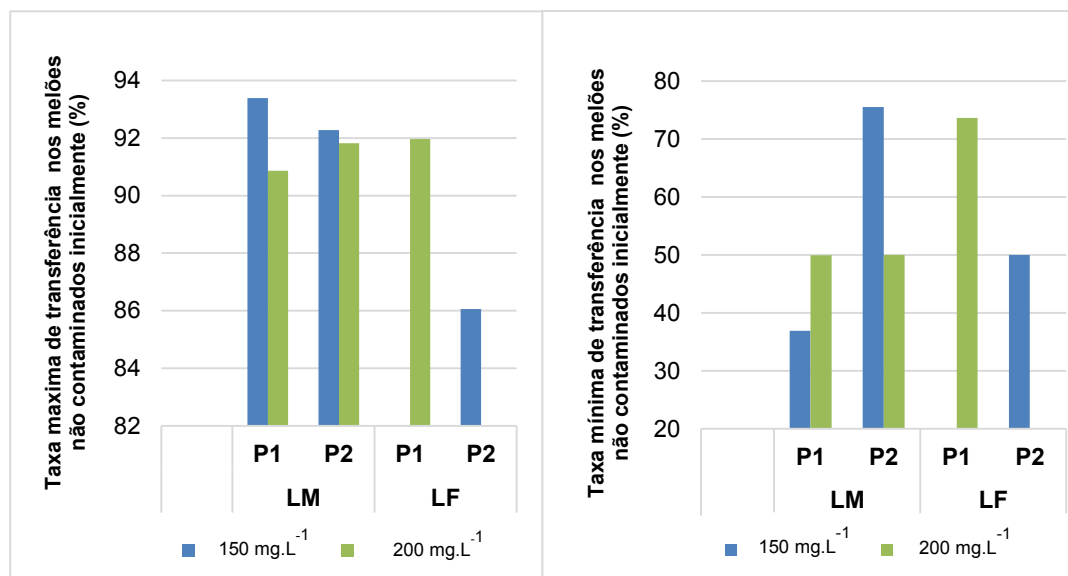


Figura 9: Taxas máximas e mínimas de transferência obtidas para *L. monocytogenes* (LM) e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* (LF) após a simulação dos processos de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.

Ainda que a simulação dos processos de contaminação cruzada fossem realizadas durante a etapa de sanitização das frutas esperava-se que as populações bacterianas fossem reduzidas em maior proporção, já que o número de amostras contaminadas era muito menor ao número de amostras não contaminadas inicialmente, mas os resultados obtidos são concordantes com os dados reportados na literatura.

As reduções nas populações estudadas se apresentaram de acordo com a concentração da solução sanitizante e independentemente do processo simulado da seguinte forma: para *L. monocytogenes* de 1,8 log (UFC/fruta) à concentração de 150 mg.L⁻¹ do sanitizante e de 1,9 log (UFC/fruta) à concentração de 200 mg.L⁻¹ e para *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* de 2,2 e 1,3 log (UFC/fruta) a 150 mg.L⁻¹ e de 200 mg.L⁻¹, respectivamente. De acordo, com os processos de contaminação simulados e independentemente da concentração do sanitizante, da seguinte forma: para *L. monocytogenes* no processo 1 de 1,8 log (UFC/fruta) e no processo 2 de 1,9 log (UFC/fruta) e para *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* no processo 1 de 1,3 log (UFC/fruta) e no processo 2 de 2,3 log (UFC/fruta).

Da mesma forma, numerosas pesquisas indicam que o cloro tem limitada eficiência antibacteriana, alcançando apenas reduções logarítmicas entre 1,0 e 2,0 ciclos logarítmicos nas populações bacterianas estudadas presentes em alimentos crus nas concentrações permitidas (ABADIAS et al., 2008; SIROLI, 2015). Jung et al., (2016) reportou reduções decimais na população de *L. monocytogenes* presente na superfície de melão após de ser sanitizado com água eletrolisada e um sanitizante ácido de 1,6 log (UFC.g⁻¹) e 0,9 log (UFC.g⁻¹) respectivamente. Em estudos realizados em alface cortada e inoculada com *L. monocytogenes* em uma concentração aproximada a 10⁸ log (UFC.ml⁻¹), após ser sanitizada com uma solução clorada a 200 µg.ml⁻¹, determinaram-se reduções decimais na faixa entre 1,1 e 1,8 log (UFC) por amostra de alface, o qual ratifica as reduções determinadas em outros tipos de produtos (BEUCHAT, 1998; LANG et al., 2004).

No entanto, existem diversos fatores extrínsecos que podem interferir na ação do sanitizante sobre a redução dos micro-organismos como o pH, temperatura e dureza da água, entre outros (HOELZER et al., 2012). Dentre estes, outros que se podem considerar, são principalmente referentes às características físicas da superfície da fruta que é sanitizada. Com respeito ao melão, sua superfície é coberta por uma cera bem desenvolvida e rugosa que pode variar em espessura, a qual pode favorecer a adesão dos micro-organismos. Da mesma forma, também pode apresentar algumas vezes, injúrias que fornecem proteção bacteriana por evitar o contato direto com a solução sanitizante (UKUKU e SAPERS, 2001; UKUKU et al., 2012).

Em pesquisas desenvolvidas, os resultados indicaram que algumas cepas de micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Cryptosporidium parvum* e *L. monocytogenes*, têm apresentado certo grau de resistência à ação de sanitizantes clorados (NASCIMENTO et al., 2005; PARISH et al., 2003; ZHANG et al., 2005).

O aumento da resistência bacteriana aos sanitizantes à base de cloro empregados durante as etapas de higienização e sanitização de alimentos crus, é uma preocupação na produção de alimentos, já que estes micro-organismos que podem ou conseguem sobreviver, podem chegar aos consumidores e provocar a ocorrência de surtos de doenças veiculadas por alimentos.

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade das células de *L. monocytogenes* para sobreviver ao estresse oxidativo quando é modificado seu ambiente ou pela exposição a substâncias oxidantes como produtos químicos, detergentes e sanitizantes como peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio entre outros, e pelos quais os micro-organismos ativam seus mecanismos de reparação de danos de proteínas, membranas e ácidos nucleicos. Também podem ser ativados seus sistemas de desintoxicação bacteriana para controlar espécies reativas de oxigênio (EROs) que incluem enzimas como a superóxido dismutase, catalase e alquilhidroperoxidase, que têm demonstrado ser importantes na proteção ao micro-organismos sob estas condições. (LUNGU et al., 2009; MELO et al., 2015).

Da mesma forma, quando o processo de sanitização é ineficiente pode desencadear a ocorrência de episódios de contaminação cruzada (LYNCH, TAUXE, e HEDBERG, 2009; OLAIMAT e HOLLEY, 2012), uma vez que os micro-organismos podem se espalhar durante o processamento dentro das instalações da fábrica (áreas de preparação, corte, lavagem e empacotamento), nos equipamentos (correias transportadoras, centrífugas, canais, entre outros) ou na água utilizada, tanto na etapa de lavagem como na etapa de sanitização (POSADA-IZQUIERDO, 2013), que foi claramente demonstrado e corroborado por meio da análise de cada uma das amostras de melão que foram sanitizadas com um água que encontrava-se contaminada.

6.3. Efeito da temperatura de estocagem na capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* em melão após a simulação da contaminação cruzada, corte e embalagem

Os resultados obtidos da quantificação da multiplicação de *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* no melão demonstram que a transferência de micro-organismos para a superfície das frutas pode afetar o produto final a ser consumido em diferentes condições e tempos, uma vez que evidencia-se que o micro-organismo pode se transferir da superfície da fruta para a faca e desta para o interior (polpa) do melão.

Estudos desenvolvidos sobre transferência bacteriana em alimentos que são cortados, têm mostrado a veiculação dos micro-organismos de

equipamentos como cortadoras e facas, para os alimentos não contaminados, como por exemplo cebola, tomate (SCOLLON et al., 2016; WANG e RYSER, 2016) e presunto (CHAITIEMWONG et al., 2014).

Os dados obtidos da multiplicação bacteriana das cepas estudadas, nos diferentes tempos avaliados (12, 18, 24, 48 e 72 h.) demonstraram que a *L. monocytogenes* tem a capacidade de multiplicar-se à temperaturas de refrigeração como 12 °C e 5 °C, já que as contagens bacterianas foram superiores às contagens no tempo zero (Figura 10), ao passo que *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* se multiplicou apenas a 12 °C em amostras associadas com o processo 2 (150 mg.L⁻¹). Para as outras condições, o micro-organismo foi inibido (Figura 10).

O aumento do número de UFCs nos diferentes tempos de análises, para *L. monocytogenes* demonstra a capacidade desse micro-organismo se adaptar e multiplicar em baixas temperaturas, e ser caracterizado como um micro-organismo psicotrófico.

Vários estudos têm obtido as curvas de crescimento de diferentes espécies de *Listeria spp.* e de diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*, demonstrando assim a capacidade de crescimento deste gênero bacteriano a diversas temperaturas de refrigeração e sendo classificada como uma bactéria psicotrófica (CARPENTIER e CERF, 2011; UKUKU et al., 2012; FANG et al., 2013; DANYLUK et al., 2014).

Da mesma forma, a capacidade da internalização e capacidade de multiplicação de micro-organismos patogênicos como *Salmonella spp* e *L. monocytogenes* tem sido estudada em frutas e hortaliças como tomate, manga, melão, melancia, mamão, entre outros. Por exemplo, estudos em salsão reportaram a diminuição das populações de *L. monocytogenes* após ser cortado e estocado a 4 °C, e um aumento entre 0,5 e 0,3 log (UFC.g⁻¹) em um período de 7 dias quando estocado a 12°C e 22 °C, respectivamente (VANDAMM et al., 2013). De igual modo, a capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em couve cortada foi demonstrada pelo aumento da população em 1,2 log (UFC.cm²) ao longo de 14 dias a uma temperatura de refrigeração de 5°C (ELLS e HANSEN, 2010).

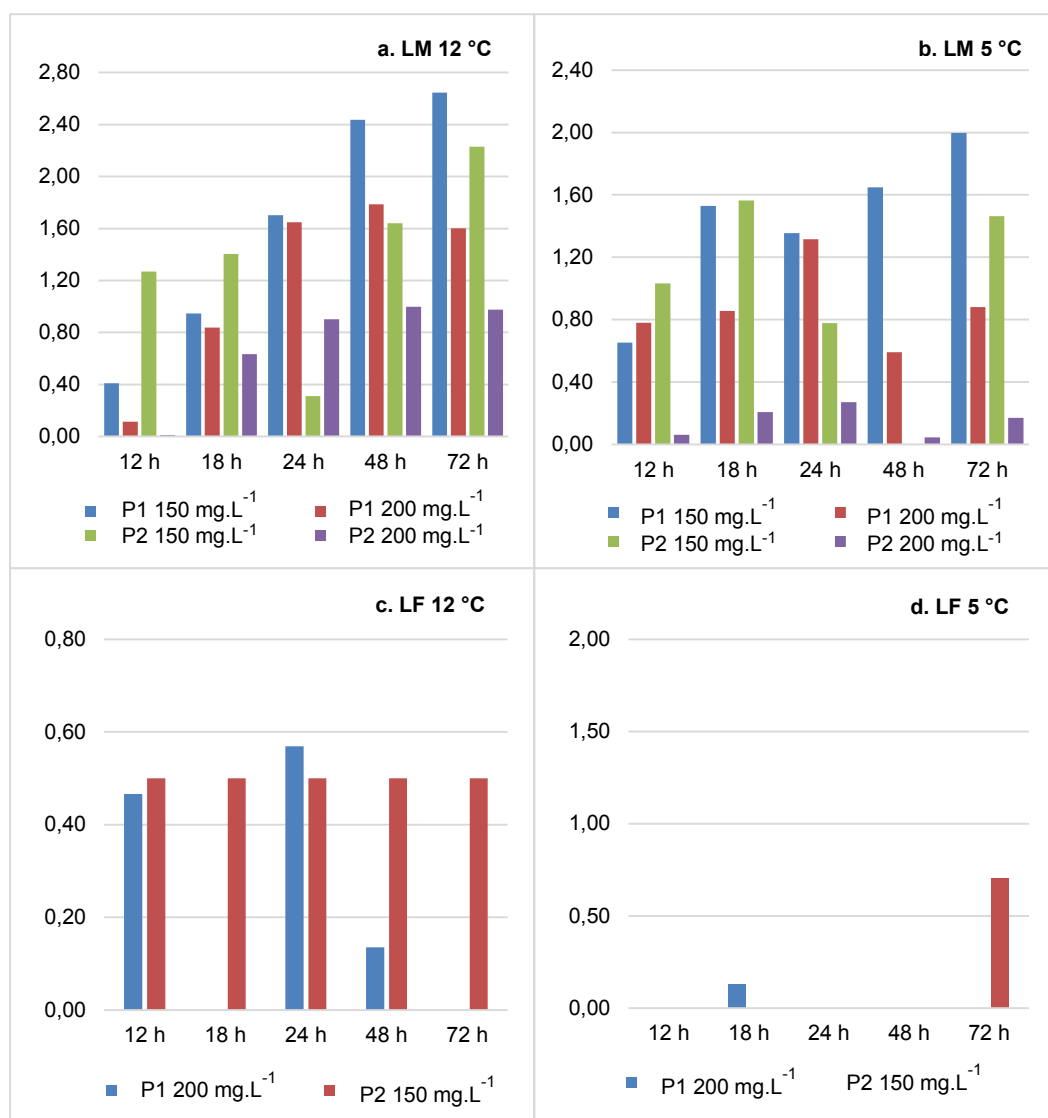


Figura 10: Multiplicação de *L. monocytogenes* (LM) e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* (LF) em log (UFC.g⁻¹) depois do tempo zero a diferentes temperaturas, após a simulação dos processos de contaminação cruzada (P1 – processo 1 e P2 – processo 2) durante a etapa de sanitização a diferentes concentrações.

Com respeito ao melão, a estrutura da superfície auxilia para que as bactérias presentes no solo e/ou outras superfícies contaminadas possam se aderir fortemente (PARNELL et al., 2005; UKUKU e FETT, 2002), permanecer e sobreviver durante dias, o que aumenta a probabilidade da ocorrência de episódios de contaminação cruzada ou recontaminação durante o corte da fruta (UKUKU et al., 2006) e transferir bactérias como *Salmonella*, *E. coli* e *L.*

monocytogenes para a polpa do melão (VADLAMUNDI et al., 2012; UKUKU et al., 2012; DANYLUK, 2013). De acordo com Harris et al., (2003), o melão cortado apresenta baixa acidez (pH entre 5,2 e 6,7), alta atividade de água (entre 0,97 e 0,99) e alto conteúdo de açúcares, sendo assim capaz de suportar o crescimento de micro-organismos patogênicos como *L. monocytogenes* (FANG et al., 2013; PALEKAR et al., 2004), e pelo qual a fruta tem sido relacionada em vários surtos de doenças veiculadas por alimentos (DANYLUK et al., 2014; FANG et al., 2013).

Estudos desenvolvidos sobre a cinética de multiplicação de *L. monocytogenes* na polpa de melão cortada em cubos de 10 g $\pm$ 1 g, inoculadas com uma população aproximada de 10^3 UFC por cada 10 g de amostra e refrigeradas a diferentes temperaturas (4, 10, 15, 20 e 25 °C), demonstraram que a bactéria tem a capacidade de multiplicar-se nessa faixa de temperaturas, além de que, as taxas de crescimento calculadas aumentaram à medida que a temperatura de refrigeração era mais alta (DANYLUK et al., 2014). Assim como também no estudo realizado por Fang et al., (2013), em melão fresco cortado, inoculado com três sorotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, e 4b) e incubado a temperaturas compreendidas entre os 4 °C até os 43 °C, foram obtidas diferentes curvas de crescimento destes micro-organismos tanto para as temperaturas de refrigeração como de abuso.

Igualmente, foi estudada a sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* inoculada em melões inteiros e armazenados a diferentes temperaturas (4, 10 e 25 °C). As análises foram feitas em diferentes tempos e evidenciaram um aumento na população avaliada de $5,8 \pm 0,1$ log (UFC/melão) para $7,6 \pm 0,4$ log (UFC/melão), após 15 dias de armazenamento a 4 °C. Após de 9 dias de armazenamento a 10 °C as contagens aumentaram para $6,4 \pm 0,7$ log (UFC/melão) e na temperatura de abuso apenas no primeiro dia de armazenamento a população aumentou de $5,8 \pm 0,1$ para $7,2 \pm 0,6$ log (UFC/melão), pelo qual concluíram que a *L. monocytogenes* tem a capacidade de multiplicar-se nas três temperaturas avaliadas e que o aumento na temperatura está diretamente relacionado com o aumento do crescimento do micro-organismo (NYARKO et al., 2016). Esses dados concordam com a pesquisa desenvolvida previamente por Ukuku et al., (2015), onde demonstram

que a transferência de *L. monocytogenes* para a polpa do melão após de seu corte e estocagem sob refrigeração, afeta a sobrevivência e crescimento de alguns dos micro-organismos da população avaliada, mas não inibe a capacidade de multiplicação de todos.

O gênero *Listeria* tem a capacidade de sobreviver e multiplicar em um amplo intervalo de temperaturas, incluindo baixas temperaturas de refrigeração (2 - 45 °C), o que é um fator que torna as espécies deste gênero de difícil controle na indústria de alimentos. Esta habilidade está dada pela sua resposta ao estresse à baixas temperaturas, já que ao perceber mudanças na temperatura, a célula realiza uma série de alterações na composição lipídica da membrana para manter sua fluidez, a qual é necessária para manter o transporte de solutos através da membrana e uma atividade enzimática adequada. No caso de *L. monocytogenes* ocorre um encurtamento do comprimento da cadeia de ácidos graxos, o que diminui a interação carbono-carbono entre cadeias vizinhas na membrana da célula e isso ajuda a manter o grau ótimo de fluidez da membrana para o crescimento à baixas temperaturas (BEALES, 2004). Também podem se apresentar alterações na expressão de genes e indução de sínteses de proteínas. Em *L. monocytogenes*, sintetizam-se as proteínas de choque frio (Csps) em resposta ao choque térmico, além de proteínas que ajudam a célula a adaptar-se a temperaturas de refrigeração (Caps) (LIU et al., 2002).

7. CONCLUSÕES

Foi possível determinar que tanto *L. monocytogenes* como *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* tem a capacidade de serem transferidas durante a etapa de sanitização da superfície das frutas contaminadas para a água de sanitização, da água de sanitização para a superfície das frutas não contaminadas e para a água de enxague.

Ainda que os valores de permanência encontraram-se próximos entre os micro-organismos estudados, esses foram maiores nos melões contaminados com *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* independentemente do processo de contaminação simulado e da concentração do sanitizante empregada.

Independentemente das condições experimentais avaliadas, tanto a transferência de *L. monocytogenes* como de *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* para as águas de sanitização foi menor que para as águas de enxague (potável e destilada). Com respeito às águas de enxague, a transferência foi menor para a água potável do que para a água destilada, provavelmente, porque na água potável ainda havia presença de cloro e os micro-organismos ainda encontravam-se injuriados.

A porcentagem de contaminação nas amostras avaliadas após a simulação dos processos de contaminação durante a etapa de sanitização, foi maior para *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* (100%) do que para *L. monocytogenes* (96%).

Apesar de entre os tratamentos avaliados para os dois micro-organismos estudados, as taxas de transferência tenham sido muito próximas, as taxas de transferência mais altas foram determinadas para *L. monocytogenes* na concentração de 150 mg.L⁻¹, independentemente do processo de contaminação simulado.

Ainda que *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* tenha apresentado a média de transferência bacteriana mais alta 6,7 log (UFC/fruta), este valor não foi diferente estatisticamente quando comparado com a transferência de *L. monocytogenes*.

Corroborou-se que *L. monocytogenes* tem a capacidade de sobreviver e multiplicar-se na polpa do melão nas temperaturas de refrigeração estudadas (12 e 5 °C), enquanto a *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* tem a capacidade de sobreviver a ambas temperaturas estudadas, mas só se multiplicou a 12 °C.

Demonstrou-se que *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis* podem ocasionar episódios de contaminação cruzada durante o corte do melão, já que as bactérias podem ser transferidas da superfície para a polpa por meio da faca, e ter a capacidade de sobreviver e, ou multiplicar-se em condições de estocagem sob refrigeração, representando assim um risco potencial para a indústria de alimentos e para a saúde dos consumidores.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma das etapas fundamentais no processamento de alimentos *in natura* é a sanitização, que visa a redução e, ou eliminação dos micro-organismos deterioradores e, ou patogênicos presentes na superfície do produto, além de evitar a possível ocorrência de episódios de contaminação cruzada, pelo qual o controle apropriado de todas as variáveis que interferem em seu desenvolvimento (qualidade da água, tipo de sanitizante, concentração do sanitizante, tempo de contato, entre outros), e seu monitoramento é muito importante para poder assim, garantir tanto a eficiência do processo como a qualidade microbiológica do produto.

O controle da contaminação superficial em alimentos que posteriormente serão cortados é importante, pois podem-se ocasionar episódios de contaminação cruzada pela transferência bacteriana da casca até a polpa, pelo qual o uso de práticas adequadas de sanitização, manuseio e preparação são muito importantes para evitar possíveis surtos de doenças veiculadas por alimentos.

Apesar de na etapa de sanitização serem obtidas reduções significativas das populações bacterianas aderidas à superfície do alimento, evidenciou-se que a realização da sanitização não é suficiente para controlar totalmente a contaminação bacteriana e evitar a ocorrência de episódios de contaminação cruzada por *L. monocytogenes* e *L. fleischmannii subsp. coloradonensis*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNISALOA, K.; LUNDEN, J. KORKEALA, H.; WIRTANEN, G. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. **Elsevier LWT** **40**. Disponível on line em www.sciencedirect.com. p. 1041–1048. 2007.

ABADIAS et al. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, 123 (1–2) p. 121–129. 2008.

ABADIAS M.; ALEGRE I.; USALLA J.; TORRESA R.; VIÑAS I. Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. **Postharvest Biology and Technology** 59. p. 289–297. 2011.

ABADIAS, M., ALEGRE, I., OLIVEIRA, M., ALTISENT, R., & VIÑAS, I. Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. **Food Control**, 27(1). p. 37–44. 2012.

ABRAM, F., STARR, E., KARATZAS, K.A.G., MATLAWSKA-WASOWSKA, K., BOYD, A., WIEDMAN, M., et al. Identification of components of the sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, 74. p. 6848 – 6858. 2008.

ALLEN, K. J. et al. Review *Listeria monocytogenes*. An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology** 54. p. 178 – 189. 2016.

ALLENDE, A., MARTÍNEZ, B., SELMA, V., GIL, M. I., SUÁREZ, J. E., & RODRÍGUEZ, A. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiology**, 24(7–8). P. 759–766. 2007.

AMARO ANA L.; OLIVEIRA ANA, DOMINGOS P.F. ALMEIDA. **Processing and Impact on Active Components in Food. Biologically Active Compounds in Melon: Modulation by Preharvest, Post-harvest, and Processing Factors**. Capítulo 20. p. 165–171. 2015.

ANDERSON S. SANT'ANA; BERNADETTE D. G. M; FRANCO DONALD W. SCHAFFNER. Modeling the growth rate and lag time of different strains of

Salmonella enterica and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. **Food Microbiology** 30. p. 267 – 273. 2012.

ANDRADE, N. J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. **Livraria Varela. Revista Higiene Alimentar**. São Paulo. 2008.

ANDREW M. SCOLLON, HAIQIANG WANG, ELLIOT T. RYSER. Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of onions. **Food Control**, 65. p. 160 – 167. 2016.

ANGELIDIS, A.S., SMITH, G.M. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. **Appl. Environ. Microbiol**, 69 (12). p. 7492 – 7498. 2003.

ANONYMOUS. Europe (EU) summary report on zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks 2012. **EFSA Journal**, 12(2). p. 3547. 2014.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Erna Regina Reetz, et al. Santa Cruz do Sul: **Editora Gazeta Santa Cruz**. ISSN 1808-4931. 2015.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Cleiton Evandro dos Santos, et al. Santa Cruz do Sul: **Editora Gazeta Santa Cruz**. ISSN. p. 1808-4931, 2014.

APONIENE KRISTINA, PASKEVICIUTE EGLE, REKLAITIS IGNAS, LUKSIENE ZIVILE. Reduction of microbial contamination of fruits and vegetables by hypericin-based photosensitization: Comparison with other emerging antimicrobial treatments. **Journal of Food Engineering** 144. p. 29-35. 2015.

ARTÉS, F., GÓMEZ, P., AGUAYO, E., ESCALONA, V., & ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**, 51(3). p. 287–296. 2009.

BAI XIAO-HANG, TENG LU-HUA, LÜ DE-QING AND QI HONG-YAN. Co-Treatment of EFF and 1-MCP for Enhancing the Shelf-Life and Aroma Volatile Compounds of Oriental Sweet Melons (*Cucumis melo* var. makuwa Makino). **Journal of Integrative Agriculture** 13(1). p. 217-227. 2014.

BARTON BEHRAVESH, C., JONES, T. F., VUGIA, D. J., LONG, C., MARCUS, R., SMITH, K., et al. Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance

network (FoodNet), 1996-2005. **Journal of Infectious Diseases**, 204, p. 263-267. 2011.

BAUR, S., KLAIBER, R., WEI, H., HAMMES, W. P., & CARLE, R. Effect of temperature and chlorination of pre-washing water on shelf-life and physiological properties of ready-to-use Iceberg lettuce. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 6(2). p, 171 – 182. 2005.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comp. Rev. Food Sci. Food Safety**, 3 (1). p. 1 – 20. 2004.

BECKER, L.A., EVANS, S.N., HUTKINS, R.W., BENSON, A.K. Role of sigma B in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. **J. Bacteriol**, 182 (24). p. 7083 – 7087. 2002.

BELTRÁN, D., SELMA, M. V., TUDELA, J. A., & GIL, M. I. Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. **Postharvest Biology and Technology**, 37(1). p. 37–46. 2005.

BERTSCH, D., RAU, J., EUGSTER, M. R., HAUG, M. C., LAWSON, P. A., LACROIX, C. MEILE, L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal Syst Evol Microbiol**, 63, p. 526–532. 2013.

BUCHANAN, R. L; GORRIS, L. G.M; HAYMAN, M. M; JACKSON, T. C; WHITING, R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, 75. p. 1 – 13. 2017.

CAPONIGRO, V., VENTURA, M., CHIANCONE, I., AMATO, L., PARENTE, E., & PIRO, F. Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. **Food Microbiology**, 27(8). p. 1071–1077. 2010.

CARPENTIER, B., CERF, O. Reviewe Persistence of *Listeria monocytogenes* in foodindustry equipment and premises. **Int. J. Food Microbiology**, 145, p. 1-8. 2011.

CARRASCO, E., PEREZ-RODRÍGUEZ, F., VALERO, A., GARCÍA-GIMENO, R. M., & ZURERA, G. Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. **Food Control**, 19. p, 487 - 494. 2008.

CARRASCO et al. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, Issue 2, p. 545-556. 2012.

CARTWRIGHT, E. J., JACKSON, J. A., JOHNSON, S. D., GRAVES, L. M., SILK, B. J., & MAHON, B. E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases**, 19(1). p. 1-9. 2013.

CASTEEL, M. J., SCHMIDT, C. E., & SOBSEY, M. D. Chlorine disinfection of produce to inactivate hepatitis A virus and coliphage MS2. **International Journal of Food Microbiology**, 125(3), p. 267–273. 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Cantaloupe from Mexico - United States and Canada, 2000–2002. *Morb.Mortal. Wkly.* **Multistate outbreaks of Salmonella serotype Poona infections associated with eating**. Rep. 51, p. 1044–1047. 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Effect of chlorination on inactivating selected microorganisms www.cdc.gov/safewater/chlorinationtable.htm. **Centers for Disease Control and Prevention**, Atlanta, GA, USA. 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Summary of notifiable diseases e United States, 2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 57, p. 1- 94. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Summary of notifiable diseases**. United States, Available at <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5853.pdf>. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupesjensenfarms/120811/index.html>. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado**. Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html/>. 2012a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Prevention Vital Signs: *Listeria* Illnesses, Deaths, and Outbreaks United States, 2009 - 2011.** In: MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 62, pp. 448 e 452. , 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis linked to whole canteloupes from jenson farms, colorado** (final update). Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis linked to blue bell creameries products (final update).** Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html>. 2015a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2015b). **Sprouts and investigation of human listeriosis cases (final update). Wholesome Soy Products, Inc.** Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html>. 2015b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Multistate outbreak of listeriosis linked to commercially produced, prepackaged caramel apples made from bidart bros. Apples (final update).** Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>. 2015c.

CHAITIEMWONG N., HAZELEGER W.C., BEUMER R.R., ZWIETERING M.H. Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. **Food Control** 44. p. 177-184. 2014.

CHEN, Y., ALLARD, E., WOOTEN, A., HUR, M., SHETH, I., LAASRI, A., et al. Recovery and growth potential of *Listeria monocytogenes* in temperature abused milkshakes prepared from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak. **Frontiers in Microbiology**, 18 <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00764>. 2016.

CLASEN., THOMAS., EDMONDSON., P. Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 209. p. 173 -181. 2006.

CORBO, M. R., DEL NOBILE, M. A., & SINIGAGLIA, M. A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, 106 (1), p. 69–73. 2006.

EFSA. **Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin**. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). EFSA J. 11 (1), 3025 (Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal). 2013.

DE AZEREDO, G. A., STAMFORD, T. L. M., NUNES, P. C., GOMES NETO, N. J., DE OLIVEIRA, M. E. G., & DE SOUZA, E. L. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, 44(5). p.1541 - 1548. 2011.

DYCHDALA, G.R. Chlorine and chlorine compounds. In: Block, S.S. (Ed.), **Disinfection, Sterilization and Preservation**, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, p. 135–157. 2001.

FARBER, J. M. Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. **International Journal of Food Microbiology**, 62(3). p. 247 - 251. 2000.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting report. Microbiological risk assessment series Rome-Italy**. pp. 158. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION (FAO). Codex Committee on fresh fruits and vegetables. **Mexico City: Comission of Codex Alimentarius**, Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/ccffv16/ff16_11e.pdf. 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION U.S. (FDA). **Final Update on Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/CORENetwork/ucm272372.htm#final>. 2011.

GAO, HE., LIU, CHENGCHU. Biochemical and morphological alteration of *Listeria monocytogenes* under environmental stress caused by chloramine-T and sodium hypochlorite. **Food Control**. 46. p. 455 – 461. 2014.

GAUL, L. K., FARAG, N. H., SHIM, T., KINGSLEY, M. A., SILK, B. J., & HYYTIA-TREES, E. **Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by**

contaminated diced celeryd Texas, 2010. Clinical Infectious Diseases, 56(1), 20e26. [http://dx.doi.org/ 10.1093/cid/cis817](http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis817). Epub 2012 Sep 20. 2013.

GIL, M.I., SELMA, M.V., LOPEZ-GALVEZ, F., ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal Food Microbiology**. 134, p. 37-45. 2009.

GLASS, K. A., GOLDEN, M. C., WANLESS, B. J., BEDALE, W., & CZUPRYNSKI, C. Growth of *Listeria monocytogenes* within a caramel-coated apple microenvironment. **mBio**, 6(5). <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01232-15>. e01232e15. 2016.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M., RAGAERT, P., JEYACHCHANDRAN, V., DEBEVERE, J., & DEVLIEGHERE, F. Shelf-life of minimally processed lettuce and cabbage treated with gaseous chlorine dioxide and cysteine. **International Journal of Food Microbiology**, 121(1). p. 74–83. 2008.

GRAVES, L. M.; HELSEL, L. O; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E., DANESHVAR, M. I.; ROOF, S. E.; ORSI, R. H.; FORTES, E. D.; MILILLO, S. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal Syst Evol Microbiology**, v. 60, p. 1280–1288. 2010.

HAECHLER, H., MARTI, G., GIANNINI, P., LEHNER, A., JOST, M., BECK, J., et al. **Outbreak of listeriosis due to imported cooked ham, Switzerland 2011.** Euro surveillance, 18 (18). P. 20469. 2013.

HAJAR IQBAL ISMAIL, KIM WEI CHAN, ABDALBASIT ADAM MARIOD, MAZNAH ISMAIL. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. **Food Chemistry** 119. p. 643–647. 2010.

HALTER, E. L., NEUHAUS, K., SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant Lemna trisulca of a German fresh water pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 641 e 647. 2013.

HENK C. DEN BAKKER.; CLYDE S. MANUEL.; ESTHER D. FORTES.; MARTIN WIEDMANN.; KENDRA K. NIGHTINGALE. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3257–3268. 2013.

HERVERT-HERNÁNDEZ D.; GARCÍA O.P.; ROSADO J.L; GOÑI I. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and

antioxidant capacity in a Mexican rural diet: importance of fruit and vegetable variety. **Food Res. Int.** 44, p.1182–1189. 2011.

HOELZER, K., POUILLOT, R., GALLAGHER, D., SILVERMAN, M. B., KAUSE, J., & DENNIS, S. Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation. **International Journal of Food Microbiology**, 157. p. 267-277. 2012.

HOELZER, K., SAUDERS, B. D., SANCHEZ, M. D., OLSEN, P. T., PICKETT, M. M., MANGIONE, K. J., et al. Prevalence, distribution, and diversity of *Listeria monocytogenes* in retail environments, focusing on small establishments and establishments with a history of failed inspections. **Journal of Food Protection**, 74. p. 1083-1095. 2011.

HUA, G. H., & RECKHOW, D. A. Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. **Water Research**, 41(8), 1667–1678. 2007.

HUI LI SIM, YOON-KI HONG, WON BYONG YOON, HYUN-GYUN YUK. Behavior of *Salmonella spp.* and natural microbiota on fresh-cut dragon fruits at different storage temperatures. **International Journal of Food Microbiology** 160. p. 239–244. 2013.

INATSU, Y., BARI, L., KAWASAKI, S., ISSHIKI, K., & KAWAMOTO, S. Efficacy of acidified sodium chlorite treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese cabbage. **Journal of Food Protection**, 68(2). p. 251 - 255. 2005.

ISMAIL, H. I., CHAN, K. W., MARIOD, A. A., & ISMAIL, M. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. **Food Chemistry**, 119(2), p. 643-647. 2010.

JUNG, Y.; GAO, J.; JANG, H.; GUO, M.; R., MATTHEWS, K. Sanitizer efficacy in preventing cross-contamination during retail preparation of whole and fresh-cut cantaloupe. **Food Control**. p. 1 – 8. 2016.

KESKINEN, L. A., BURKE, A., & ANNOUS, B. A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, 132(2–3). p. 134–140. 2009.

LANG, M.M.; HARRIS, L. J.; BEUCHAT, L.R. Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on Lettuce and Parsley as affected by method of inoculation, time between inoculation

and analysis, and treatment with chlorinated water. **Journal of Food Protection**, 67- 6. p. 1092 – 1103. 2004.

LANG HALTER, E.; NEUHAUS, K. E SCHERER, S. *Listeria weihen stephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a fresh water pond. **International Journal Syst Evol Microbiol**, v. 63, p. 641–647. 2013.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P. A. D.; LE FLÉCHE- MATÉ OS, A.; ROCHE, S. M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal Syst Evol Microbiology**, v. 60, p. 2210–2214. 2010.

LIN, C.-M., KIM, J. DU, W.- X.; WEI, C.-I. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh cut produce. **Journal Food Protection**, 63. p, 25–30. 2000.

LIU, C. C., SU, Y.C. Efficiency of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing gloves. **International Journal of Food Microbiology**. 110(2). p.149 - 154. 2006.

LIU, S., GRAHAM, J.E., BIGELOW, L., MORSE, P.D., WILKINSON, B.J. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. **Appl. Environ. Microbiol.** 68 (4). p,1697 – 1705. 2002.

LUNGU, B., RICKE, S.C., & JOHNSON, M.G. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. **Food Microbiology**, 15. P, 7 – 17. 2009.

LUO, Y., NOU, X., YANG, Y., ALEGRE, I., TURNER, E., FENG, H., ABADIAS, M., CONWAY, W., Determination of free chlorine concentrations needed to prevent *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination during fresh-cut produce wash. **Journal Food Prot.** 74, p. 352–516. 2011.

MACEDO, J.A.B., BARRA, M.M., Derivados clorados de origem orgânica uma solução para o processo de desinfecção de água potável e para desinfecção de indústrias. In: **VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. 2002.

MANDRELL R. E.; GORSKI L.; BRANDL M.T. **Microbiology of Fruits and Vegetables**. CRC Press Inc., Albany, CA. , 2006.

MEENU N. PERERA; TAMAR ABULADZE; MANRONG LI; JOELLE WOOLSTON; ALEXANDER SULAKVELIDZE. Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. **Food Microbiology** 52. p. 42 – 48. 2015.

MELO, J.; ANDREW, P.W.; FALEIRO, M.L. Review. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, 67. p, 75–90. 2015.

MILLER, F. A., RAMOS, B., GIL, M. M., BRANDÃO, T. R. S., TEIXEIRA, P., & SILVA, C. L. M. Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. **International Journal of Food Microbiology**, 133(1–2). p. 121–128. 2009.

MØLLER, C.O.A.; SANT'ANA, A.S.; HANSEN, S.K.H.; NAUTA, M.J.; SILVA, L.P.; ALVARENGA, V.O.; MAFFEI, D. et al., Evaluation of a cross contamination model describing transfer of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* during grinding of pork and beef. **International Journal of Food Microbiology**, 226. p. 42–52. 2016.

MUNTER DANIEL.; SUN XIAODAN.; XIAO YANNI.; TANG SANYI.; SHIMOZAKO HELIO.; WU JIANHONG.; et al. Modeling cross-contamination during poultry processing: Dynamics in the chiller tank. **Food Control** 59. p. 271-281. 2016.

MURIEL-GALET, V.; CERISUELO, J. P.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; AUCEJO, S.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Evaluation of EVOH-coated PP films with oregano essential oil and citral to improve the shelf-life of packaged salad. **Food Control**, 30(1), p. 137–143. 2013.

NYARKO E.; KNIEL K. E. et al. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on whole cantaloupes is dependent on site of contamination and storage temperature. **International Journal of Food Microbiology**, 234. p. 65–70. 2016.

NYSTRÖN, T. Stationary-phase physiology. **Annu. Rev. Microbiology.**, 58. p, 161- 181. 2004.

OLAIMAT, A. N.; HOLLEY, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. **Food Microbiology**, 32(1), p.1–19. 2012.

OLIVEIRA M., ABADIAS M., USALL J., TORRES R., TEIXIDO N., VINAS I. Application of modified atmosphere packaging as a safety approach to fresh-

cut fruits and vegetables e A review. **Trends in Food Science & Technology** 46. p. 13-26. 2015.

OLSZEWSKA, M. A.; ZHAO T.; DOYLE M. P. Inactivation and induction of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in biofilm treated with various sanitizers. **Food Control**, 70. p. 371 – 379. 2016.

PALEKAR M. P.; MATTHEW T.; TAYLOR J. MAXIM E.; CASTILLO A. Reduction of *Salmonella enterica* serotype Poona and background microbiota on fresh-cut cantaloupe by electron beam irradiation. **International Journal of Food Microbiology** 202. p. 66–72. 2015.

PARISH M. E., et al. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. V. 2. p. 161-173. 2003.

POSADA-IZQUIERDO, G.D.; PÉREZ-RODRÍGUEZ F.; ZURERA G. Mathematical quantification of microbial inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* on stainless steel surfaces soiled with different vegetable juice substrates. **Food Research International**, 54. p. 1688 – 1698. 2013.

POUILLOT, R., KLONTZ, K. C., CHEN, Y., BURALL, L. S., MACARISIN, D., DOYLE, M., et al. Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream United States, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, 22. p, 2113 - 2119. 2016.

RAMOS B., MILLER F. A., BRANDÃO T. R. S., TEIXEIRA P., SILVA C. L. M. Fresh fruits and vegetables. An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. V. 20, p. 1–15. 2013.

RAMASWAMY, V., CRESENCE, V. M., REJITHA, J. S., LEKSHMI, M. U., DHARSANA, K. S., PRASAD, S. P., et al. *Listeria* e review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 40(1), p. 4 - 13. 2007.

RICO, D., MARTIN-DIANA, A. B., BARAT, J. M., & BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 18(7). p. 373 - 386. 2007.

RIETBERG, K., LLOYD, J., MELIUS, B., WYMAN, P., TREADWELL, R., OLSON, G., et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to a

pasteurized ice cream product served to hospitalized patients. **Epidemiology and Infection**, 144. p, 2728 - 2731. 2015.

RYAN, E.M., GAHAN, C.G., HILL, C. A significant role for Sigma B in the detergent stress response of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.** 46, p. 148 - 154. 2008.

SALAZAR, J. K., CARSTENS, C. K., BATHIJA, V. M., NARULA, S. S., PARISH, M., & TORTORELLO, M. L. Fate of *Listeria monocytogenes* in fresh apples and caramel apples. **Journal of Food Protection**, 79. P, 696 - 702. 2016

SCALLAN, E., GRIFFIN, P.M., ANGULO, F.J., TAUXE, R.V., HOEKSTRA, R.M., **Foodborne illness acquired in the United States unspecified agents**. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 16 - 22. 2011.

SHEN, C., LUO, Y., NOU, X., BAUCHAN, G., ZHOU, B., WANG, Q., MILLNER, P. Enhanced inactivation of *Salmonella* and *Pseudomonas* biofilms on stainless steel by use of T-128, a fresh-produce washing aid, in chlorinated wash solutions. **Food Microbiology**. 78, p. 6789–6798. 2012.

SIROLI, L., PATRIGNANI, F., SERRAZANETTI D. I., GARDINI, F., LANCIOTTI, R. Innovative strategies based on the use of bio-control agents to improve the safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, 46, p. 302 – 310. 2015.

SOUZA P. **Avaliação de *Listeria monocytogenes* em melão e jabuticaba**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2014.

STEPHAN R., ALTHAUS D., KIEFER. et al. Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: A nationwide outbreak in Switzerland, 2013-2014. **Food Control**, 57. p. 14-17. 2015.

UKUKU, DIKE O. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. **Food Microbiology**, 23. p. 289 – 293. 2006.

UKUKU, DIKE O.; HUANG LIHAN; SOMMERS, CHRISTOPHER. <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-14-233>. **Journal of Food Protection**, 78 – 7. p. 1288 -1295. 2015.

USDA. **Food composition database**.http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl. 2010.

USDA - ERS. **Fruit & Tree Nuts.** Available at: <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/fruit-tree-nuts/background.aspx>. 2012.

VAN DER VEEN, S., ABEE, T. Importance of Sig B for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. **Appl. Environ. Microbiol.** 76. p. 7854 - 7860. 2010.

VAN KAPPEL, A. L., STEGHENS, J. P., ZELENIUCH-JACQUOTTE, A., CHAJES, V., TONIOLO, P., & RIBOLI, E. Serum carotenoids as biomarkers of fruit and vegetable consumption in the New York Women's health study. **Public Health Nutrition**, 4(3), p. 829-835. 2001.

VELAZQUEZ, L. D., BARBINI, N. B., ESCUDERO, M., ESTRADA, C., & DE GUZMAN, A. M. S. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. **Food Control**, 20(3). p. 262 – 268. 2009.

VOULDOUKIS, I., LACAN, D., KAMATE, C., COSTE, P., CALENDIA, A., MAZIER, D., ET AL. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a *Cucumis melo* LC. Extract rich in superoxide dismutase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 94(1), p. 67-75. 2004.

WERBER, D., HILLE, K., FRANK, C., DEHNERT, M., ALTMANN, D., MÜLLER-NORDHORN, J., et al. Years of potential life lost for six major enteric pathogens, Germany, 2004-2008. **Epidemiology and Infection**, 141. p. 961-968. 2013.

XUETONG F.; KIMBERLY J.; SOKORAI. Formation of trichloromethane in chlorinated water and fresh-cut produce and as a result of reaction with citric acid. **Postharvest Biology and Technology** 109. p. 65–72. 2015.

YANG Y.; S-KRAJNIK, M. M. et al. Biofilm formation of *Salmonella enteritidis* under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. **Food Microbiology**, 54. p. 98 – 105. 2016.

YAHIA, E.M., The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In: Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilara, G.A. (Eds.), **Fruit and Vegetable Phytochemicals Chemistry Nutritional Value and Stability**. Wiley-Blackwell, Hoboken, p. 3 - 51. 2010.

ZHANG Y., YEH, E., HALL, G., CRIPE, J., BHAGWAT, A. A., & MENG, J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, 113, p. 47 - 53. 2007.

ZHANG, G., MA, L., PHELAN, V.H., DOYLE, M.P., Efficacy of antimicrobial agents in lettuce leaf processing water for control of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal Food Prot.** 72, p. 1392 - 1397. 2009.

ZWEIFEL, C., STEPHAN, R. Spices and herbs as source of *Salmonella* related foodborne diseases. **Food Research International**, 45(2), p. 765 –769. 2012.