

AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE PRODUTOS  
MINIMAMENTE PROCESSADOS COMERCIALIZADOS EM  
BOTUCATU/SP. PERFIL GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DAS  
CEPAS DE *Staphylococcus* sp, EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO  
DE BIOFILME E DE ENTEROTOXINAS

**BRUNA LOURENÇO DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia de parasitas e micro-organismos.

*Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU-SP**

**2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE PRODUTOS  
MINIMAMENTE PROCESSADOS COMERCIALIZADOS EM  
BOTUCATU/SP. PERFIL GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DAS  
CEPAS DE *Staphylococcus* sp, EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO  
DE BIOFILME E DE ENTEROTOXINAS

**BRUNA LOURENÇO DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia de parasitas e micro-organismos.

*Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU-SP**

**2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE PRODUTOS  
MINIMAMENTE PROCESSADOS COMERCIALIZADOS EM  
BOTUCATU/SP. PERFIL GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DAS  
CEPAS DE *Staphylococcus* sp, EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO  
DE BIOFILME E DE ENTEROTOXINAS**

**BRUNA LOURENÇO DA SILVA  
VERA LÚCIA MORES RALL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia de parasitas e micro-organismos.

*Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU-SP**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Silva, Bruna Lourenço da.

Avaliação higiênico-sanitária de produtos minimamente processados comercializados em Botucatu/SP - Perfil genotípico e fenotípico das cepas de *staphylococcus* sp, em relação à produção de biofilme e de enterotoxinas / Bruna Lourenço da Silva. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lucia Mores Rall

Capes: 21201005

1. Enterotoxinas. 2. Biofilme. 3. Microbiologia – Pesquisa. 4. Hortaliças – Qualidade. 5. Frutas – Comércio – Botucatu (SP). 6. Estafilococos.

Palavras-chave: Biofilme; Enterotoxinas; Estafilococos coagulase negativa; Estafilococos coagulase positiva; Frutas; Hortaliças; Qualidade.

**Esse trabalho é dedicado a minha família e amigos que estiveram presentes em  
mais essa etapa importante da minha vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

*Á minha mãe, Vanilza, que acreditou no meu potencial e trabalhou duro para que eu pudesse chegar até essa etapa muito importante da minha vida. Sem seu amor, eu nada seria.*

*À minha orientadora, Prof. Dra. Vera Lucia Mores Rall, pela orientação, confiança amizade e por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto e pela bolsa de Mestrado.*

*Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e companheirismo. Formamos uma grande equipe nesses dois anos que se passaram. Sou eternamente grata pela ajuda que tive de cada um em todas as etapas.*

*Aos Professores e demais funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia.*

*Às minhas amigas da República TNT, que foram a minha família durante todo o meu Mestrado.*

*Ao Bruno, pelo amor, apoio, paciência, amizade e por ter sido o meu porto seguro até agora. Obrigada pela felicidade e alegria que traz para minha vida.*

*Á todos meus amigos de Barra Bonita e Bauru.*

*E a todos que contribuíram para que eu cumprisse mais esta etapa.*

## ***ÉPIGRAFE***

**"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos. "**

**Isaac Newton**

## ***SUMÁRIO***

<b>RESUMO</b>	.....	1
<b>ABSTRACT</b>	.....	3
<b>INTRODUÇÃO</b>	.....	5
<b>OBJETIVOS</b>	.....	13
 <b>CAPÍTULO 1</b>	.....	14
Título	.....	15
Resumo	.....	16
Abstract	.....	18
Introdução	.....	20
Material e Métodos	.....	22
Resultados e Discussão	.....	25
Referências	.....	30
 <b>REFERÊNCIAS GERAIS</b>	.....	35



## RESUMO

Os alimentos minimamente processados surgiram como uma interessante alternativa para o consumidor que procura por produtos de boa qualidade, saudáveis e de fácil preparo e consumo. No entanto, micro-organismos patogênicos podem estar presentes desde a produção ou serem introduzidos através de equipamentos e utensílios mal higienizados ou pela manipulação inadequada. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi a avaliação microbiológica de hortaliças, legumes e frutas minimamente processados, em relação aos parâmetros microbiológicos descritos na legislação brasileira, que permite até  $10^2$ /g de coliformes termotolerantes para hortaliças e até  $5 \times 10^2$ /g, para frutas, na ausência de *Salmonella* em 25 gramas do produto. Entretanto, a legislação não contempla a pesquisa de *Staphylococcus aureus*, bactéria potencialmente produtora de enterotoxinas, cujo habitat é a mucosa nasal e que pode ser transmitida aos alimentos pela intensa manipulação. Dentro do mesmo gênero, existem as espécies de estafilococos coagulase negativa (ECN), que apresentam grande potencial patogênico, por possuírem os mesmos genes para a produção de enterotoxinas, encontrados em *S. aureus*. Assim, o trabalho também objetivou o isolamento dessas bactérias, a pesquisa dos genes que codificam a produção de enterotoxinas clássicas e biofilme e, a partir da presença dos genes, foi pesquisada a produção *in vitro* desses fatores. A produção de biofilme foi verificada em plástico, aço inoxidável e vidro. Foram analisadas 200 amostras, e nenhuma apresentou contaminação por *Salmonella*, mas 157 (78,5%) estavam fora dos limites aceitáveis em relação à quantidade de coliformes termotolerantes. Em relação aos estafilococos, 50 amostras (25%) apresentaram contaminação por ECN e 7 (3,5%), por estafilococos coagulase positiva (ECP), sendo isoladas 6 (60%) *Staphylococcus aureus* e 4 (40%) *S. hyicus*. Entre as 62 cepas de ECN, 53 (85,5%) foram identificadas como *S. xylosus*, 6 (9,7%) como *S. epidermidis* e 3 (4,8%) como *S. warneri*. Os genes *sea*, *seb* e *sec* não foram observados em nenhuma das espécies de estafilococos. Contudo, *sed* esteve presente em 5 (83,3%) cepas de *S. aureus* e em 13 (24,5%) cepas de *S. xylosus*, sendo que todas as cepas de ECP foram produtoras dessa enterotoxina *in vitro*, enquanto apenas uma cepa de ECN foi produtora dessa enterotoxina *in vitro*. Em relação aos genes responsáveis pela produção de biofilme, a presença dos genes *bap*, *icaA*, e *icaD* não foi observada em nenhuma das cepas isoladas de ECP. Porém, das 62 cepas isoladas de ECN, 5 (10%) foram positivas para o gene *icaD* e nenhuma apresentou os genes *bap* e *icaA*. Nenhuma das cepas de

ECP e ECN produziu biofilme em placa de poliestireno, o que era esperado pela ausência dos principais genes envolvidos. Entre os ECN, somente 3 cepas de *S. xylosus* produziram biofilme em superfície de aço inox, sendo classificada como fortemente produtora e 2 cepas de *S. epidermidis* produziram biofilme em superfície de vidro, sendo classificada como fraca produtora. De acordo com os resultados obtidos, a maioria dos produtos minimamente processados analisados estão impróprios para o consumo, apresentando níveis de contaminação acima do recomendado pela legislação. A presença do gene responsável pela produção de enterotoxina em bactérias do gênero *Staphylococcus*, isolados de alimentos minimamente processados, aumentam o potencial patogênico desse grupo e traz maior risco aos consumidores desse tipo de alimento.

Palavras-chave: frutas; hortaliças; legumes; qualidade; biofilme; enterotoxinas; estafilococos coagulase negativa; estafilococos coagulase positiva.

## ABSTRACT

Minimally processed foods emerged as an interesting alternative for the consumer that seeks for products with good quality, which are healthy, easy to prepare and to consume. Nevertheless, pathogenic microorganisms may be present in these products since production, or may be introduced by badly sanitized equipment and utensils, or by improper manipulation. Therefore, the objective of this work was the microbiological evaluation of minimally processed vegetables and fruits, regarding the microbiological parameters described in the Brazilian law, which allows for up to  $10^2$  thermotolerant coliforms in vegetables and up to  $5 \times 10^2$  in fruits, in the absence of *Salmonella* in 25 grams of the product. However, the law does not consider the research of *Staphylococcus aureus*, bacteria that is a potential producer of enterotoxins, whose habitat is the nasal mucosa and that may be transmitted to food by the intense manipulation they are subjected. In the same genus, there are the coagulase-negative staphylococci species (CoNS), which presents huge pathogenic potential, for having the same genes for enterotoxin production found on *S. aureus*. Thus, this work also aims the isolation of these bacteria, the research of genes that codify for the production of classical enterotoxins and biofilm and, as from the presence of these genes, the research of the production *in vitro* of enterotoxins and biofilm. The biofilm production was tested on plastic, stainless steel and glass, which are the most used materials in equipments and utensils. 200 samples were analyzed, and none presented contamination by *Salmonella*, although 157 (78.5%) were outside the acceptable limits regarding the quantity of thermotolerant coliforms. From these 200 samples of minimally processed products, 50 (25%) presented coagulase-negative staphylococci (CoNS) and 7 (3.5%) presented coagulase-positive staphylococci (CoPS), from which 10 strains of CoPS were isolated and 6 (60%) were identified as *Staphylococcus aureus* and 4 (40%) as *S. hyicus*. Among the 62 strains of CoNS, 53 (85%) were identified as *Staphylococcus xylosus*, 6 (10%) as *S. epidermidis* and 3 (5%) as *S. warneri*. The sea, seb and sec genes were not observed in any of the staphylococci species. However, sed was present in 5 (83.3%) strains of *S. aureus* and in 13 (24.5%) strains of *S. xylosus*, whereas all the CoPS species were producers of this enterotoxin *in vitro*, while only one of the CoNS strains was considered a producer of this enterotoxin *in vitro*. Regarding the genes responsible for biofilm production, the presence of the genes *bap*, *icaA* and *icaD* was not observed in any of the CoPS strains isolated. However, among the 62 CoNS strains

isolated, 5 (8%) presented the *icaD* gene and none of them presented the *bap* and *icaA* genes. None of the CoNS and CoPS strains produced biofilm on polystyrene plates or on glass surface, which was expected by the absence of the genes responsible for this production. Among CoNS strains, only 3 strains of *S. xylosus* produced biofilm on stainless steel surfaces, being classified as strong producers, and 2 strains of *S. epidermidis* produced biofilm on glass surfaces, being classified as weak producers. According to the obtained results, the minimally processed products analyzed are improper for human consumption, presenting contamination levels above law recommendation. The presence of the gene responsible for enterotoxin production in bacteria of the *Staphylococcus* genus, isolated from minimally processed foods, increases the pathogenic potential of this group and brings more risk to the consumers of these products.

Keywords: fruits, vegetables, legumes quality; biofilm; enterotoxin; coagulase-negative staphylococci; coagulase positive staphylococci.

## 1. INTRODUÇÃO

As frutas e hortaliças minimamente processadas surgiram como uma alternativa para o consumidor que não tem tempo de preparar suas refeições. Em vários países, verificou-se que esses produtos estão sendo oferecidos nos formatos mais variados, sempre visando agregação de valor e comodidade do consumidor (MORETTI, 2007).

Existem dois grandes mercados onde os produtos minimamente processados podem ser comercializados: o mercado de varejo e o institucional. O varejo abrange as redes de supermercado, lojas de conveniência, quitandas, sacolões, etc. O mercado institucional engloba restaurantes, lanchonetes, hotéis, hospitais, universidades, empresas e todos os estabelecimentos que fornecem refeições coletivas (JACOMINO et al., 2004).

O processamento mínimo é definido como qualquer alteração física em frutas ou hortaliças com a manutenção do frescor desses produtos, incluindo as operações de seleção, lavagem, corte, sanificação, centrifugação, embalagem, armazenamento e comercialização (MORETTI, 1999). As injúrias provocadas nos tecidos, por ocasião do corte, elevam a atividade respiratória e a produção de etileno, contribuindo para a síntese de enzimas envolvidas em mudanças fisiológicas e bioquímicas, propiciando a proliferação dos micro-organismos presentes, inclusive os prejudiciais à saúde humana (WILEY, 1994; BRETCH, 1995).

Os micro-organismos patogênicos podem contaminar os vegetais desde sua produção e podem estar presentes no solo, água de irrigação, água utilizada para aplicar fungicidas, inseticidas, poeira, insetos, compostagem inadequada de adubos, adubo orgânico, animais domésticos e selvagens e a manipulação humana (BEUCHAT, 2002; BRACKETT, 1999).

Dentre os fatores que influenciam a qualidade das frutas pré-cortadas, encontram-se as condições de crescimento da cultivar, as práticas culturais, o tipo de cultivar adotado, o ponto e os métodos de colheita, o manuseio, os padrões de inspeção e as condições de armazenamento destes produtos (ALVES et al., 2000).

No processamento mínimo, são poucas as técnicas utilizadas para eliminação de micro-organismos ou controle do crescimento microbiano, incluindo a lavagem, o uso de sanitizantes, embalagens em atmosfera modificada e refrigeração. Na maioria das vezes a cadeia de frio não é respeitada, o que possibilita o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos ao homem (VANETTI, 2004).

Souza (2001) relatou que os itens frescor, refrigeração inadequada, contaminação por bactérias e germes totalizam 55,6% da preocupação dos consumidores, afetando diretamente a qualidade dos produtos minimamente processados, indicando que o aspecto qualidade realmente interessa ao consumidor. Tal relato indicou que a preocupação com a qualidade deixou de ser uma simples exigência burocrática dos órgãos de regulamentação e inspeção, passando a ser uma estratégia fundamental e indispensável para garantir a competitividade (MORETTI, 2003).

A RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabeleceu que os alimentos minimamente processados tenham controle microbiológico, através das pesquisas de *Salmonella* e coliformes termotolerantes.

### **1.1. Qualidade Higiênico-Sanitária**

A segurança dos alimentos tem sido amplamente discutida por causa do aumento do número de surtos e pela importância desse fator no comércio internacional de alimentos. Para minimizar esses problemas, boas práticas de produção e novos parâmetros de produção e processamento foram regulamentados (STEWART et al., 2002). As indústrias devem implantar o uso de Boas Práticas de Fabricação (BPF) até a adoção de ferramentas de gestão de qualidade, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para assegurar aos consumidores que seus produtos estejam livres de contaminação química, física ou microbiológica (BASTOS, 2007).

A atividade microbiana em produtos minimamente processados pode ser influenciada pelo metabolismo do vegetal, pela atmosfera modificada, pela embalagem utilizada e pela temperatura de estocagem (FANTUZZI et al., 2004). A qualidade higiênica desses alimentos está relacionada à presença de micro-organismos deteriorantes, que irão influenciar as alterações sensoriais do produto durante sua vida útil (VANETTI, 2004).

Uma vez que os alimentos e a água podem servir como veículos de agentes patogênicos ao homem, micro-organismos indicadores, como os coliformes termotolerantes, são geralmente usados para monitorar sua qualidade, classificando e restringindo seu uso (MÖLLERKE, et al., 2002).

O grupo dos coliformes termotolerantes pertence à família Enterobacteriaceae, sendo bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás à 45°C em até 24 horas (FRANCO e LANGDRAF, 2003). O habitat dos coliformes é o trato intestinal do homem e de outros animais e fazem parte desse grupo os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, sendo que os dois últimos também podem ser encontrados no ambiente (SILVA et al., 2005).

De acordo com Ray (1996), *E. coli*, além de indicar contaminação fecal, indica a possível presença de patógenos entéricos e pode, por si só, representar risco à saúde, pois algumas cepas são patogênicas. Sua presença em alimentos crus é considerada um fator de contaminação fecal direta ou indireta. A direta ocorre durante o processamento de matérias-primas de origem animal, devido à falta de higiene pessoal dos manipuladores. A indireta pode ocorrer através de águas poluídas e de esgoto.

Há diversas categorias de cepas de *E. coli* que podem carrear diferentes fatores de virulência. Algumas não são invasivas, mas produzem uma toxina que pode causar uma diarreia aquosa. Outras invadem a parede intestinal, causando inflamação, febre e disenteria. Ainda existem linhagens que causam inflamação do cólon com sangramento profuso e síndrome hemolítico-urêmica (TORTORA et al., 2005). A dose mínima infectante pode variar de 10 a 10000 células por grama ou mililitro de produto consumido, dependendo do sorotipo envolvido (NASCIMENTO e STAMFORD, 2000).

Oliveira e colaboradores (2005) analisaram amostras de alface minimamente processadas em Fortaleza, Ceará, e observaram contagens elevadas de coliformes a 45°C, micro-organismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras, indicando que a sanitização e as condições higiênico-sanitárias durante o processamento foram insatisfatórias. É um fato ainda mais preocupante quando se considera que os minimamente processados geralmente são prontos para consumo imediato, o que expõe o consumidor a um risco ainda maior.

Segundo Fröder et al (2007), em um estudo feito na cidade de São Paulo, 73% das amostras de minimamente processadas analisadas apresentavam concentração de coliformes termotolerantes maiores que  $10^2$  UFC/g.

## **1.2. Patógenos**

### **1.2.1. *Salmonella***

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae. São bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, oxidase negativa e catalase positiva. A maioria é móvel devido à presença de flagelos peritríqueos, com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que são imóveis (GOLDEN et al., 1993; VISSONI, 2003).

Esse gênero é composto por duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a primeira contém seis subespécies, além de muitos sorovares de acordo com os antígenos somático, flagelar e capsular presentes. São conhecidos atualmente mais de 2.610 sorovares diferentes, dos quais o maior número está na espécie *S. enterica* subsp. *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Apesar do grande número de sorovares, poucos são comumente associados com doenças em seres humanos, que geralmente se apresentam como uma gastroenterite autolimitada, febre entérica mais grave ou febre tifoide (IBARRA & STEELE-MORTIMER, 2009).

A *Salmonella* apresenta adaptação fisiológica muito grande, como é evidenciado pelo crescimento entre pH de 4,5 a 9,5 e temperaturas que variam de 5 a 47°C, sendo sua temperatura ideal de crescimento é entre 35 e 37°C (FRANCO e LANDGRAF, 2003; VISSONI, 2003).

Os seres humanos, animais, alimentos e o ambiente são potenciais reservatórios de *Salmonella*. Seu principal habitat é o trato intestinal do homem e animais. No ambiente, as principais fontes do patógeno são a água, o solo, fezes de animais, insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios de indústrias e cozinhas (TIETJEN e FUNG, 1995).

A febre tifóide, causada por *S. Typhi*, só acomete o homem e não possui reservatórios em animais. Normalmente, a forma de disseminação da infecção é interpessoal e através da água e alimentos contaminados com material fecal humano. Os



sintomas são muito graves e incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômitos. Após a infecção, os indivíduos podem se tornar portadores por meses ou anos, constituindo uma fonte contínua de infecção (SHINOHARA et al., 2008).

Na febre entérica, o agente etiológico é a *S. Paratyphi* A, B e C e os sintomas clínicos são mais brandos que em relação à febre tifóide, podendo evoluir para septicemia e frequentemente desenvolver um quadro de gastroenterite, febre e vômitos. O período de incubação é, usualmente, de 6 a 48 horas e a duração média da doença é de três semanas. Essa doença pode ser causada pelo consumo de água e alimentos, especialmente leite e vegetais crus, mariscos e ovos (SHINOHARA et al., 2008).

Infecções entéricas em decorrência de outras salmonelas são também chamadas de salmoneloses e desenvolvem um quadro de infecção gastrointestinal, com dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos clínicos fatais. Os sintomas aparecem de 12 a 36 horas, podendo durar até 72 horas. Trata-se da manifestação mais comum de infecção por *Salmonella*, autolimitada em dois a três dias, não necessitando de tratamento com antibióticos (SHINOHARA et al., 2008).

### **1.2.2. *Staphylococcus* sp**

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae, sendo cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e tendem a formar agrupamentos em formato semelhante a cachos de uva. São micro-organismos mesófilos que se desenvolvem entre 7°C e 47,8°C e produzem enterotoxinas entre 10°C a 46°C (TRABULSI et al., 2001; GERMANO e GERMANO, 2003).

Os portadores possuem um papel importante na manutenção e disseminação desses micro-organismos, especialmente pessoas ligadas a atividades relacionadas com processamento de alimentos e saúde (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002).

*Staphylococcus aureus* não faz parte dos padrões microbiológicos para minimamente processados (MP), entretanto, sua presença pode causar doenças de origem alimentar, se houver abuso de tempo e temperatura. Esse micro-organismo é considerado um dos maiores causadores de intoxicação de origem alimentar e pode estar presente como um membro persistente ou temporário na microbiota nasal humana, sem causar nenhum sintoma. A presença dessa bactéria nos alimentos é frequentemente causada pela manipulação imprópria de alimentos, por pessoas portadoras deste micro-organismo (HATAKKA et al., 2000).

*S. aureus* é considerada a única espécie patogênica entre os *Staphylococcus*, enquanto os estafilococos coagulase negativa (ECN) tem sido classificados como contaminantes em alimentos (KLOOS AND BANNERMAN, 1994). Mais recentemente, vários autores têm sugerido que esse grupo de micro-organismo deve ser melhor estudado, a fim de se verificar seu real papel, nos casos de intoxicações, pois os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas podem estar presentes (VERAS et al., 2008; RALL et al., 2010a; RALL et al., 2010b).

As enterotoxinas estafilocócicas clássicas são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de 26 a 29 KDa, caracterizadas por uma ponte dissulfeto, próximo ao centro da molécula. Os cinco tipos sorológicos clássicos foram identificados e designados pelas letras A, B, C, D e E (BERGDOLL & ROBBINS, 1973). Apresentam grandes quantidades de lisina, ácido aspártico, glutâmico, tirosina, dois resíduos de triptofano e cistinas, formando a cisteína, à qual, provavelmente, se atribui o sítio de toxicidade. A composição dos aminoácidos das toxinas A, D, E, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> são semelhantes (BERGDOLL, 1989).

Essas enterotoxinas são consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais (FERNANDEZ et al., 2006).

A enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) é a mais comumente implicada nos casos de intoxicação alimentar. O gene *entA* é composto por 771 pares de base e carregado por um bacteriófago temperado (BORST & BETLEY, 1994). O gene *entB* regula a produção da enterotoxina do tipo B (SEB), que apresenta, aproximadamente, 900 nucleotídeos (JOHNS & KHAN, 1988). Esse gene pode estar integrado ao DNA bacteriano, no caso de amostras clínicas ou carregado por um plasmídeo de 750Kb, em amostras de outras origens (SHAFER & IANDOLO, 1978).

O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigenicamente distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC3. Segundo Marr et al. (1993), a enterotoxina C é heterogênea e apresenta variações antigênicas e em sua sequência molecular, ocorrendo ainda, as variantes SEC bovina e SEC ovina, cuja classificação é baseada em diferenças antigênicas e no animal hospedeiro da qual foi isolada e a enterotoxina estafilocócica tipo D (SED), é o segundo tipo mais comum, associado a

casos de intoxicação alimentar. O gene responsável por essa toxina é o *entD*, estando localizado no plasmídeo PIB 485 (BAYLES e IANDOLO, 1989).

### 1.3. Produção de Biofilme

Os biofilmes apresentam bactérias fortemente aderidas a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálice e envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos (COSTERTON et al., 1999).

Falhas no processo de higienização permitem que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação na indústria de alimentos. Os micro-organismos podem aderir às superfícies, interagindo com as mesmas e iniciando a multiplicação celular (OLIVEIRA et. al., 2006). Quando a massa bacteriana é suficientemente espessa para agregar nutrientes, resíduos e outros organismos, o biofilme está estabelecido (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994).

Os biofilmes em condições naturais tendem a ser compostos por micro-organismos em culturas mistas e são considerados mais resistentes aos produtos utilizados comumente para limpeza e sanificação (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos micro-organismos, que aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (PVCs) do que às hidrofílicas (vidro ou metais). Estudos mostraram que a adesão microbiana se torna maior com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão (DONLAN & COSTERTON, 2002). Micro-organismos patogênicos em biofilmes são uma das principais fontes de contaminação dos alimentos e de infecções clínicas (DONLAN & COSTERTON, 2002).

A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA) ou poly-N-succinil- $\beta$ -1,6-glucosamina e a síntese é codificada pelos genes *icaABCD*. Os genes e produtos do locus *ica* foram demonstrados fundamentais para a formação de biofilmes e virulência dos micro-organismos (O' TOOLE et al., 2000; STANLEY & LAZAZZERA, 2004).

Uma proteína de superfície que também parece estar associada à produção de biofilme é a chamada Bap (*biofilm-associated protein*). O gene *bap* está contido em uma ilha de patogenicidade (SaPIbov2) e codifica para uma proteína com 2.276 aminoácidos que atua na primeira fase de aderência à superfície (CUCARELLA et al.,

2004). Bap promove tanto a ligação primária a superfícies inertes quanto à adesão intracelular, onde PIA/PNAG parece estar envolvido apenas na adesão intracelular. Curiosamente, o gene bap está contido em uma ilha de patogenicidade móvel (UBEDA et al., 2003).

## **2. OBJETIVOS**

**2.1** Avaliação higiênico-sanitária de produtos prontos ao consumo, pela determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes.

**2.2** Pesquisa de *Salmonella* (obrigatória pela RDC N°12).

**2.3** Enumeração de *Staphylococcus* sp, pesquisa da presença dos genes relacionados com a produção de enterotoxinas clássicas e de biofilme, assim como a pesquisa da produção desses fatores de virulência *in vitro*.

## **CAPÍTULO 1**

Este trabalho deu origem ao artigo “Avaliação higiênico-sanitária de produtos minimamente processados. Perfil genotípico e fenotípico das cepas de *Staphylococcus* sp, em relação à produção de biofilme e de enterotoxinas”, que foi submetido para publicação no periódico “Food Control”.

AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE PRODUTOS MINIMAMENTE  
PROCESSADOS. PERFIL GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DAS CEPAS DE  
*STAPHYLOCOCCUS* SP, EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO DE BIOFILME E DE  
ENTEROTOXINAS.

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF READY TO EAT FOOD. GENOTYPIC  
AND PHENOTYPIC PROFILE OF *STAPHYLOCOCCUS* SP STRAINS, RELATED  
TO THE PRODUCTION OF BIOFILM AND ENTEROTOXINS.

Bruna Lourenço da Silva<sup>1</sup>, Mirella Zanutto Rossito<sup>2</sup>, Paulo Eduardo Budri<sup>2</sup>, Livia Gramolini Baptistão<sup>2</sup>, Ivana Giovannetti Castilho<sup>2</sup>, João Pessoa Araújo Júnior<sup>2</sup>, Vera Lúcia Mores Rall<sup>2</sup>

1 - Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual

2 - Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

**Autor para correspondência:**

Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

Caixa-Postal 510

CEP 18618-970, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP – Brasil.

Telefone: (14) 38116240 ramal 215, Fax (14) 38116240

e-mail: vlmores@ibb.unesp.br

## RESUMO

Os alimentos minimamente processados surgiram como uma interessante alternativa para o consumidor, que procura por produtos de boa qualidade, saudáveis, de fácil preparo e consumo. A qualidade microbiológica desses alimentos está relacionada com a presença de micro-organismos deteriorantes que irão influenciar as alterações sensoriais do produto durante sua vida útil. Ainda, micro-organismos patogênicos podem estar presentes desde a produção ou serem introduzidos através de equipamentos e utensílios mal higienizados ou pela manipulação inadequada. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade higiênico-sanitária de 200 amostras de hortaliças, legumes e frutas minimamente processados, comercializados em Botucatu/SP pela determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes (CT), a pesquisa de *Salmonella* e de *Staphylococcus* sp. Também se verificou a presença dos genes relacionados com a produção de enterotoxinas clássicas e de biofilme, assim como a pesquisa da produção desses fatores de virulência *in vitro* pelas cepas de *Staphylococcus* sp. *Salmonella* não foi observada em nenhuma das amostras analisadas, mas 157 amostras (78,5%) estavam fora dos limites aceitáveis em relação à quantidade de coliformes termotolerantes. Em relação aos estafilococos, das 200 amostras, 50 (25%) apresentaram contaminação por ECN e 7 (3,5%), por estafilococos coagulase positiva (ECP), sendo isoladas 6 (60%) *Staphylococcus aureus* e 4 (40%) como *S. hyicus*. Entre as 62 cepas de ECN, 53 (85,5%) foram identificadas como *S. xylosus*, 6 (9,7%) como *S. epidermidis* e 3 (4,8%) como *S. warneri*. Os genes *sea*, *seb* e *sec* não foram observados em nenhuma das espécies de estafilococos. Contudo, *sed* esteve presente em 5 (83,3%) cepas de *S. aureus* e em 13 (24,5%) cepas de *S. xylosus*, sendo que todas as cepas de ECP foram produtoras dessa enterotoxina *in vitro*, enquanto apenas uma cepa de ECN foi produtora dessa enterotoxina *in vitro*. Em relação aos genes responsáveis pela produção de biofilme, a presença dos genes *bap*, *icaA*, e *icaD* não foi observada em nenhuma das cepas isoladas de ECP. Porém, das 62 cepas isoladas de ECN, 5 (8%) cepas foram positivas para o gene *icaD* e nenhuma apresentou os genes *bap* e *icaA*. Nenhuma das cepas de ECP e ECN produziu biofilme em placa de poliestireno, o que era esperado pela ausência dos principais genes envolvidos. Entre os ECN, somente 3 cepas de *S. xylosus* produziram biofilme em superfície de aço inox, sendo classificada como fortemente produtora e 2 cepas de *S. epidermidis* produziram biofilme em



superfície de vidro, sendo classificada como fraca produtora. De acordo com os resultados obtidos, a maioria dos produtos minimamente processados analisados estão impróprios para o consumo, apresentando níveis de contaminação acima do recomendado pela legislação. A presença do gene responsável pela produção de enterotoxina em bactérias do gênero *Staphylococcus*, isolados de alimentos minimamente processados, aumentam o potencial patogênico desse grupo e traz maior risco aos consumidores desse tipo de alimento.

Palavras-chave: frutas; hortaliças; legumes; qualidade; biofilme; enterotoxinas; estafilococos coagulase negativa; estafilococos coagulase positiva.

## ABSTRACT

Minimally processed foods emerged as an interesting alternative for the consumer that seeks for products with good quality, which are healthy, easy to prepare and to consume. The microbiological quality of these foods is related to the presence of deteriorating microorganisms that will influence the sensorial changes during its life cycle. Still, pathogenic microorganisms may be present since production or they may be introduced by poorly sanitized equipments and utensils or by improper manipulation. This work aims to evaluate the hygienic and sanitary quality of 200 samples of minimally processed vegetables and fruits, marketed at Botucatu/SP by the determination of the most probable number of thermotolerant coliforms (TC) and by the research of *Salmonella* and *Staphylococcus* sp. The presence of genes related to the production of classical enterotoxins and biofilm was also tested, as well as the production of enterotoxins and biofilm *in vitro* by the *Staphylococcus* sp strains. *Salmonella* was not found in any of the analyzed strains, but 157 (78.5%) samples were out of the acceptable limits regarding the quantity of thermotolerant coliforms. From these 200 samples of minimally processed products, 50 (25%) presented coagulase-negative staphylococci (CoNS) and 7 (3.5%) presented coagulase-positive staphylococci (CoPS), from which 10 strains of CoPS were isolated and 6 (60%) were identified as *Staphylococcus aureus* and 4 (40%) as *S. hyicus*. Among the 62 strains of CoNS, 53 (85%) were identified as *Staphylococcus xylosus*, 6 (10%) as *S. epidermidis* and 3 (5%) as *S. warneri*. The sea, seb and sec genes were not observed in any of the staphylococci species. However, sed was present in 5 (83.3%) strains of *S. aureus* and in 13 (24.5%) strains of *S. xylosus*, whereas all the CoPS species were producers of this enterotoxin *in vitro*, while only one of the CoNS strains was considered a producer of this enterotoxin *in vitro*. Regarding the genes responsible for biofilm production, the presence of the genes bap, icaA and icaD was not observed in any of the CoPS strains isolated. However, among the 62 CoNS strains isolated, 5 (8%) presented the icaD gene and none of them presented the bap and icaA genes. None of the CoNS and CoPS strains produced biofilm on polystyrene plates or on glass surface, which was expected by the absence of the genes responsible for this production. Among CoNS strains, only 3 strains of *S. xylosus* produced biofilm on stainless steel surfaces, being classified as strong producers, and 2 strains of *S. epidermidis* produced biofilm on glass surfaces,

being classified as weak producers. According to the obtained results, the minimally processed products analyzed are improper for human consumption, presenting contamination levels above law recommendation. The presence of the gene responsible for enterotoxin production in bacteria of the *Staphylococcus* genus, isolated from minimally processed foods, increases the pathogenic potential of this group and brings more risk to the consumers of these products.

Keywords: fruits, vegetables, legumes quality; biofilm; enterotoxin, coagulase-negative staphylococci, coagulase positive staphylococci.

## 1. INTRODUÇÃO

Mudanças demográficas relacionadas ao envelhecimento da população e novas tendências de estilo de vida com uma crescente demanda por alimentos minimamente processados prontos para o consumo têm mudado o cenário das doenças de origem alimentar em todo o mundo, com importantes impactos econômicos e sociais (Kennedy & Wall, 2007).

Alimentos minimamente processados são obtidos de produtos frescos através da seleção, lavagem, descasque, corte, sanitização, enxágue, secagem e embalagem, de modo a estender a vida de prateleira e preservar as propriedades nutritivas e sensoriais (Cruz et al., 2006).

Estes passos não são eficientes para eliminar a contaminação microbiológica desses alimentos, além disso, o armazenamento sob-refrigeração pode favorecer o crescimento de patógenos psicotróficos e micro-organismos deteriorantes (Gleeson & O'Beirne, 2005).

*S. aureus* é considerada a única espécie patogênica entre os *Staphylococcus*, enquanto os estafilococos coagulase negativa (ECN) têm sido classificados como contaminantes (Kloos and Bannerman, 1994). Mais recentemente, vários autores têm sugerido que esse grupo de micro-organismo deve ser melhor estudado, a fim de se verificar seu real papel nos casos de intoxicações, pois os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas podem estar presentes, mas sem que ocorra a produção (Veras et al., 2008; Rall et al., 2010a; Rall et al., 2010b). As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são as principais causadoras de intoxicações bacterianas no homem (Cliver, 1994), podendo causar intoxicações cujos sintomas podem ser diarreia, vômito, prostração, calafrio e febre (Bergdoll, 1989).

Os biofilmes são agregados de micro-organismos embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos por entre microcolônias. Este tipo de organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de micro-organismos por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (Melo, 2008). A composição dos biofilmes é heterogênea, pela diversidade de micro-organismos com diferentes propriedades fisiológicas e metabólicas, como resposta ao pH e

requerimentos nutricionais ocorrendo dentro da matriz polimérica. Além disso, a distribuição destes micro-organismos dentro do biofilme costuma não ser uniforme, podendo ocorrer interdependência entre as espécies, o que contribui para o aumento da resistência a agentes antimicrobianos (MARQUES, 2005).

A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA) ou poly-N-succinil- $\beta$ -1,6-glucosamina e a síntese é codificada pelos genes *icaABCD*. Os genes e produtos do locus *ica* foram demonstrados fundamentais para a formação de biofilmes e virulência dos micro-organismos (O' TOOLE et al., 2000; STANLEY & LAZAZZERA, 2004).

Outra proteína de superfície, que também parece estar associada à produção de biofilme, é a Bap (*biofilm-associated protein*). O gene *bap* está contido em uma ilha de patogenicidade (SaPIbov2) e codifica para uma proteína com 2.276 aminoácidos que atua na primeira fase de aderência à superfície (CUCARELLA et al., 2004). Bap promove tanto a ligação primária a superfícies inertes quanto à adesão intracelular, onde PIA/PNAG parece estar envolvido apenas na adesão intracelular. Curiosamente, o gene *bap* está contido em uma ilha de patogenicidade móvel (Ubeda et al., 2003).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação higiênico-sanitária de produtos minimamente processados, pela determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes, pesquisa de *Salmonella*, enumeração de *Staphylococcus* sp, pesquisa da presença dos genes relacionados com a produção de enterotoxinas clássicas e de biofilme, assim como a pesquisa da produção desses fatores de virulência *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras: Foram analisadas 200 amostras de frutas, legumes e hortaliças minimamente processados, adquiridas nos estabelecimentos que comercializam esse tipo de produto, no município de Botucatu/SP. Sendo amostras de vagem, cenoura, beterraba, repolho e couve as mais frequentes dentre as hortaliças e goiaba, melão, abacaxi e mamão as mais frequentes entre as frutas. As amostras foram transportadas sob-refrigeração até o Laboratório de Microbiologia de alimentos, no Departamento de Microbiologia e Imunologia, no Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu.

Todos os meios de cultura utilizados foram da marca Oxoid, exceto quando especificado.

### 2.2 Análises microbiológicas

2.2.1 Preparo das amostras e suas diluições: Para a análise, 25g foram homogeneizados em 225 ml de água tamponada no Stomacher (Lab Blender 400) por 30s. A partir da diluição de  $10^{-1}$ , foi preparada uma série de diluições decimais.

2.2.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes: A pesquisa de coliformes termotolerantes foi realizada pela técnica de tubos múltiplos. Foi transferido 1 ml de cada diluição para três tubos por diluição em Caldo Lauril Sulfato com tubo de Durham invertido. Após incubação a 35°C/48h, três alçadas dos tubos positivos foram transferidas para o Caldo EC e incubados a 45°C/24h. A partir dos tubos positivos, foi calculado o NMP/g (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

2.2.3 Detecção da presença de *Salmonella*: Para a detecção da presença de *Salmonella*, 25 gramas foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada tamponada. e incubado a 35°C/24 horas. A seguir, 1 mL foi transferido para o caldo tetracionato (0,2 mL de iodeto de potássio) e incubado a 35°C/24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL foi transferida para o caldo Rappaporte-Vassiliadis e foi incubado a 42°C/24 horas. Após este período, cada caldo foi semeado em ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar *Salmonella-Shigella*, incubados a 35°C/24 horas. As colônias características foram testadas no TSI, fenilalanina e API-20E (Biomérieux), confirmada usando-se o soro polivalente somático e flagelar (Probac) (ANDREWS et al, 2001).

**2.2.4 Isolamento e identificação de *Staphylococcus* sp:** Para a enumeração de *S. aureus* (Lancette & Bennett, 2001), alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram espalhadas semeadas em Ágar Baird-Parker e colocadas em estufa a 35°C por até 48 horas. Até três colônias características (colônias pretas envoltas por dois halos) foram repicadas para TSA inclinado. Os testes bioquímicos realizados foram catalase, coagulase em tubo, fator “Clumping” (kit Dry Spot, Oxoid), DNase e teste de Voges Proskauer. As cepas de estafilococos coagulase negativa foram identificadas utilizando o API Staph (Biomérieux).

**2.3 PCR:** O DNA foi extraído utilizando-se o kit comercial Mini Spin Kit (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. Os *primers* usados para detectar os genes produtores de enterotoxinas clássicas e as características da PCR, segundo Johnson et al. (1991), estão descritas na tabela 1. Os controles positivos foram *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), FRI 361 (*sed*), ATCC 12228 (negativa) e ATCC 25923 (positiva) para os genes de biofilme.

**Tabela 01:** Oligonucleotídeos e suas propriedades utilizados na detecção de genes produtores de enterotoxinas e biofilme, nas cepas de *Staphylococcus* sp.

Gene	Primer	Seqüência	Tamanho produto (bp)	Temperatura de anelamento	Referências
<i>Sea</i>	SEA-1	ttggaaacggttaaaacgaa	120	50°C	Johnson et al. (1991)
	SEA-2	gaaccttcccatcaaaaaca			
<i>Seb</i>	SEB-1	tcgcatcaaactgacaaacg	478	50°C	Johnson et al. (1991)
	SEB-2	gcaggtactctataagtgc			
<i>Sec</i>	SEC-1	gacataaaagctaggaattt	257	50°C	Johnson et al. (1991)
	SEC-2	aaatcggattaacattatcc			
<i>Sed</i>	SED-1	ctagtttggaataatctcct	317	50°C	Johnson et al. (1991)
	SED-2	taatgctatatcttatagg			
<i>Bap</i>	Bap-1	ccctatatcgaaggtgtagaattg	971	65°C	Cucarella et al. (2001)
	Bap-2	gctgtgaagttaatactgtacctc			
<i>IcaA</i>	icaA-1	cctaactaacgaaggtag	1315	49,5°C	Vadesuvan et al. (2003)
	icaA-2	aagatatagcgataagtgc			
<i>IcaD</i>	icaD-1	aaacgtaagagaggtgg	381	50°C	Vadesuvan et al. (2003)
	icaD-2	ggcaatatgatcaagatac			

pb: pares de bases

**2.4 Formação de biofilmes em microplaca:** Cada cepa foi semeada em TSB (caldo tripticase soja), incubada a 37°C/24h. A seguir, a cultura foi diluída a 10<sup>8</sup> UFC (escala

0,5 de MacFarland), utilizando-se caldo TSB. Uma alíquota de 200µl foi plaqueada, em quadruplicata, em microplaca de 96 poços, com fundo chato. As cepas de ECP foram incubadas por 48 horas e as de ECN, por 72h, ambas sem agitação. Após período de incubação específico para cada grupo, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corado com violeta cristal 1%/15 minutos. Após três lavagens com água destilada, a placa seca foi lida em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), com leitura a 570 nm. TSB não inoculado foi o branco, utilizado para corrigir o valor da absorbância e foi realizada uma média dos quatro poços. As cepas que apresentaram valores resultantes dessa correção maiores que 0,1 foram consideradas produtoras de biofilme (MACK et al., 2000, VASUDEVAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

Foram utilizados controles positivo (*S. aureus* ATCC 13.556) e negativo (*S. epidermidis* ATCC 12.228). O nível de significância empregado foi de 5%.

**2.5 Formação de biofilme em superfície de Aço inox e vidro:** No preparo das placas, foram utilizados círculos (fichas), com diâmetro de 1 cm de aço inox e e lamínulas de vidro, com diâmetro de 1,3 cm. Esses materiais foram limpos e esterilizados. Em seguida, cada ficha foi depositada no fundo de um poço de uma placa de 24 poços, estéril e com tampa. As cepas de *Staphylococcus* sp foram incubadas em caldo (BHI), a 35°C/24h. Em seguida, a cultura foi diluída até 10<sup>8</sup> UFC de bactérias, com o auxílio do Densichek (Biomeriéux). Alíquotas de 300 µL dessa diluição foram distribuídas, em triplicata, nas cavidades da placa e incubadas a 35°C/48h as cepas de ECP e 72h, para as cepas de ECN. A seguir, as fichas foram transferidas para uma nova placa. Esse passo teve como objetivo evitar a quantificação de biofilme eventualmente produzido no plástico, ao redor das fichas de diferentes materiais. Uma vez na placa nova, as fichas foram lavadas três vezes, com solução tampão (PBS, pH 7,4), para a remoção das células não fixadas e coradas com violeta cristal 1%, por 15 minutos. O corante foi removido e a placa, novamente lavada. Em seguida, o biofilme foi ressuspensionado em 300 µl de ácido acético glacial, por 15 minutos, que assegurou a homogeneidade do material corado. Um volume de 200 µL foi transferido para um microplaca de 96 poços, lida em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), em 570 nm. BHI não inoculado foi o branco, utilizado para corrigir o valor da absorbância. Em seguida, foi



realizada uma média dos três poços (VASUDEVAN et al., 2003). Os resultados foram interpretados de acordo com Stepanovic et al (2000).

**2.6 Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* sp:** As cepas de *S. aureus* foram cultivadas em caldo BHI, a 37°C/24 horas. A seguir, 0,1ml destes crescimentos foram espalhados na superfície de um celofane esterelizados, depositado sobre o ágar BHI, acrescido de 1% de extrato de levedura e incubados a 37°C/24h. A seguir, o crescimento bacteriano foi homogeneizado com 2,5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M e o volume foi centrifugado a 10.000rpm/10min/4°C e congelado (DONNELLY et al., 1967). Para a produção de enterotoxinas pelos ECNs, foram utilizados sacos de diálise (Inlab) amarrados nas pontas contendo de 50 mL de caldo BHI em concentração dupla. Os sacos foram colocados em Erlenmeyers com 36 mL de Tampão PBS pH 7,2 (NaCl 1,46M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2M) e autoclavados a 121°C/15min. A seguir, foram retirados, 18 mL do Tampão PBS. As cepas a serem testadas foram semadas em caldo BHI e, após 37°C/24h, uma alçada foi inoculada no tampão PBS, incubados a 37°C/24h, a 140 rpm. A seguir, 1 mL do tampão PBS foi centrifugado à 11.000 rpm/15min, filtrado (Millipore, 45µm) e congelados (ROBBINS, GOULD, & BERGDOLL, 1974).

Os sobrenadantes obtidos pelas duas metodologias foram testados frente às toxinas A, B, C e D, pelo método de RPLA (Oxoid), conforme recomendações do fabricante.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Qualidade higiênico-sanitária de frutas e hortaliças

**3.1.1 Coliformes termotolerantes:** Dentre as 200 amostras de frutas, legumes e hortaliças, 157 (78,5%) estavam fora do limite aceitável para coliformes termotolerantes, que preconiza até  $5 \times 10^2$  NMP/g para frutas e até  $10^2$  para hortaliças, na ausência de *Salmonella* em 25 gramas do produto (BRASIL, 2001). De acordo com os dados desse trabalho, das 57 amostras de frutas analisadas, 43 (75,4%) apresentaram-se em desacordo com a legislação vigente, pelo excesso de coliformes termotolerantes.

Em relação as hortaliças minimamente processadas, das 143 amostras analisadas, 112 (78,3%) estavam fora dos padrões microbiológicos, pelo mesmo parâmetro. Uma taxa de contaminação menor foi observada por Pinheiro et al. (2005), que avaliaram a qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza (CE) e verificaram que 43% das amostras estavam impróprias para o consumo, segundo a RDC nº12. Adjrah et al (2011), analisaram 90 amostras de vegetais minimamente processados em Lomé, no Togo, e verificaram que 87% das amostras estavam fora do padrão estabelecido para coliformes termotolerantes. Em Uberlândia (MG), Bonnas et al. (2005), em seu estudo com vegetais minimamente processados, identificaram que 100% das amostras estavam fora do padrão estabelecido pela legislação para coliformes termotolerantes. Santos et al. (2005) analisaram 30 amostras de alface, cenoura e couve minimamente processadas comercializadas em Brasília (DF) e verificaram a presença de coliformes a 45°C acima do permitido, em todas as amostras analisadas. Os resultados indicaram que esses alimentos apresentavam perigo aos consumidores, sendo necessário um maior controle da higiene desde a produção, até o momento da comercialização, além do controle da temperatura durante a estocagem. Essa alta porcentagem de alimentos impróprios ao consumo é decorrência do processamento de matéria-prima de má qualidade e/ou boas práticas de manipulação não adequadas (CHITARRA, 2005). A presença de *Salmonella* não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Resultados semelhantes foram observados por Aguila et al. (2006), que analisando rabanetes minimamente processados, também não constatarem a presença desse patógeno em nenhuma das amostras. Sasaki et al. (2006) obtiveram o mesmo resultado, verificando ausência desse micro-organismo em todas as amostras avaliadas de abóbora. Entretanto Fröder et al. (2007), em São Paulo, observaram 3% das amostras contaminadas com *Salmonella*. Abadías et. al (2008), na Espanha, analisaram a qualidade microbiológica de 300 amostras de frutas e hortaliças minimamente processadas e observaram quatro (1,3%) das amostras positivas para *Salmonella* sp. Estudos realizados na Itália, por Caponigro et al.(2010) não revelaram casos de salmonelose ligados ao consumo de vegetais minimamente processados.

3.1.2 Identificação de *Staphylococcus* sp: Entre as amostras analisadas, 50 (25%) apresentaram estafilococos coagulase negativa (ECN) e 7 (3,5%) estafilococos coagulase positiva (ECP), ocorrendo mais de uma espécie em várias amostras. A partir

das sete amostras positivas de ECP, foram isoladas e identificadas 10 cepas, sendo 6 (60%) identificadas como *Staphylococcus aureus* e 4 (40%) como *S. hyicus*. Entre as 50 amostras positivas para os ECN, 62 cepas foram identificadas. Sendo 53 (85,5%) identificadas como *Staphylococcus xylosus*, 6 (9,7%) como *S. epidermidis* e 3 (4,8%) como *S. warneri*. Das 57 amostras contaminadas, todas (100%) apresentaram contagem acima de  $10^3$  UFC/g e chegando até  $10^5$  UFC/g. A taxa de contaminação por ECP obtida neste estudo foi mais baixa do que a de Jung et al. (2005), na Coreia, onde relataram 37% das amostras de alface minimamente processados contaminadas com *S. aureus*. Adjrah et. al (2011), no Togo, não isolaram nenhuma cepa de *S. aureus* nas amostras de alimentos minimamente processados analisados. Enquanto que Young-Ho et. al (2010), em estudo realizado na Coreia, examinaram 345 amostras de hortaliças minimamente processadas e 40 amostras (11,6%) estavam contaminadas com *S. aureus*. A presença desse gênero também é considerada como um indicador higiênico do processo, uma vez que muitas espécies desse gênero colonizam as mãos e mucosas dos seres humanos, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. warnery*, *S. xylosus*, entre outros (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Portanto, as amostras contaminadas com esses patógenos sugerem manipulação inadequada por parte dos manipuladores no momento do processamento.

### **3.2 Pesquisa dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e produção *in vitro*:**

A técnica de PCR utilizada evidenciou a ausência dos genes *sea*, *seb*, *sec* nas cepas pesquisadas isoladas de ECP e ECN. Somente o gene *sed* foi observado nas 10 cepas de ECP, ocorrendo em 4 (40%) isolados de *S. aureus* e em 1 (10%) de *S. hyicus*. Entre as 62 cepas de ECN, 12 (19,3%) cepas de *S. xylosus* e 1 (1,6%) cepa de *S. epidermidis* também foram positivas para a presença desse gene.

Entretanto, somente a única (7,6%) cepa de *S. epidermidis* entre as 13 positivas para o gene produziu a enterotoxina d *in vitro* (4+). Todas as cepas de ECP que apresentaram o gene *sed* foram produtoras dessa enterotoxina *in vitro* (4+). Na Coreia, Young-Ho et. al (2010), analisaram 40 cepas de *S. aureus* isolados de vegetais minimamente processados quanto a produção de enterotoxinas e observaram que o gene *sec* não foi encontrado em nenhuma das cepas isoladas, entretanto *sea* estava presente em 23 (57,5%) cepas seguida por *sed*, presente em 2 (5%). Em 2008, Zell et. al., analisaram 35 cepas de ECN isolados de alimentos e ‘‘*startes*’’, quanto á capacidade de produzir as

enterotoxinas clássicas e observaram que 51,4% das cepas foram produtoras de, pelo menos, um tipo de enterotoxina, sendo a SED e SEH, as mais frequentes.

Os estafilococos são capazes de produzir enterotoxinas, principais causadoras de intoxicações bacterianas no homem (Hata et al., 2006). Essas enterotoxinas são termoestáveis e capazes de permanecer ativas no meio ambiente por vários dias, além de resistirem a várias enzimas proteolíticas, o que permite a sua passagem pelo trato gastrointestinal sem perda de atividade (Cliver, 1994)). Intoxicação por *S. aureus* é a segunda causa mais frequente de doenças de origem alimentar na Espanha e na França, depois de *Salmonella* e em números similares ao *Clostridium perfringens*. Na França, em 1997, *S. aureus* foi identificado como o agente etiológico em 569 de 1142 casos registrados de intoxicações. Os casos não esclarecidos podem ser explicados pela presença de outros estafilococos, coagulase positiva ou negativa, ou pela produção de outras enterotoxinas, que não as clássicas (ROSEC & GIGAUD, 2002; MARTIN et al., 2004). Apesar de a literatura demonstrar a SEA como a enterotoxina isolada de *S. aureus* mais prevalente (NORMMANNO et al., 2007), neste estudo, a SED foi a única enterotoxina encontrada. A enterotoxina estafilocócica tipo D (SED) é o segundo tipo mais comum, associado a casos de intoxicação alimentar. O gene responsável por essa toxina é o *entD*, estando localizado no plasmídeo PIB 485 (BAYLES e IANDOLO, 1989). Espécies como *S. hycus*, *S. intermedius* e vários estafilococos coagulase negativa (ECN) também têm sido envolvidos em casos de intoxicação alimentar. Udo et al., 1999, isolaram ECN de manipuladores em 50 restaurantes na cidade do Kuwait e 6% das cepas apresentaram uma ou mais enterotoxinas clássicas, sendo a mais frequente, a do tipo B. Em 1996, em um estudo realizado no sul da França, foram isoladas, de diversos alimentos, 213 cepas de *Staphylococcus aureus* e 51 de ECN, sendo que 65 (30,5%) e 9 (17,6%) eram produtores de enterotoxinas, respectivamente. Na pesquisa para produção de enterotoxinas clássicas, foram encontradas as frequências de 66% para SEC e 20,1%, 15,4%, 7,6% para SED, SEA, SEB respectivamente (ROSEC et. al, 1997).

**3.3 Biofilme:** No presente estudo, os genes *bap*, *icaA* e *icaD* não foram observados em nenhuma das cepas isoladas de ECP. Em relação aos ECN, nenhum apresentou os genes *bap* e *icaA*, porém, 5 (8%) cepas de *S. xylosus* foram positivas para o gene *icaD*.

Entre as 62 cepas de ECN e as 10 cepas de ECP, nenhuma foi capaz de produzir biofilme em placas de poliestireno. Esses resultados eram esperados pela ausência dos principais genes envolvidos nessa produção.

Entre as 62 cepas testadas de ECN, 60 (96,7%) foram consideradas não produtoras e 2 (3,2%) cepas de *S. epidermidis* foram consideradas fracas produtoras em superfície de aço inox. Entre as 10 cepas testadas de ECP, nenhuma foi capaz de produzir biofilme nessa superfície. Nos testes realizados na superfície de vidro, das 62 cepas de ECN, 59 (95,2%) foram consideradas não produtoras e 3 (4,8%) cepas de *S. xylosum* foram consideradas fortes produtoras de biofilme em superfície de vidro, o que pode ser explicado pela presença do gene *icaD* encontrado nessas cepas. Com relação às 10 cepas testadas de ECP, nenhuma foi capaz de produzir biofilme nessa mesma superfície. A baixa porcentagem de cepas produtoras de biofilme em microplaca, aço inox e vidro nesse trabalho, podem ser explicados pela falta dos genes responsáveis por essa produção. O processo de formação de biofilme por *Staphylococcus* que contém o operon *ica* ocorre pela produção de proteínas transmembranárias homólogas às transferases de PIA através do gene *icaA*. A presença do *icaD* irá favorecer esta produção. Os polímeros formados por estes dois genes atingem tamanhos reduzidos, sendo que novas e maiores cadeias são sintetizadas graças à presença do gene *icaC* (Gerke et al., 1998). Após esta fase, o gene *icaB* promove a deacetilação desta molécula, formando o PIA (Gotz, 2002). Em caso de não haver promoção desta última etapa, as bactérias não apresentam capacidade de formar biofilme através deste gene, uma vez que não irão apresentar polissacarídeos dispostos a esta função (Vuong et al., 2004). A formação de biofilme não é dependente do locus *ica*, podendo estar associada a uma série de diversos fatores, outros genes e proteínas que podem promover a formação deste aglomerado sem necessariamente haver interação do *ica*. Um dos primeiros mecanismos estudados acerca da independência do gene *ica* para a formação de biofilmes foi através da verificação da existência do operon *Bap*. O gene *bap*, além de estar envolvido na adesão primária à superfície, tem também um papel importante na relação intercelular após a formação do aglomerado bacteriano. Este último processo pode envolver também o PIA, tendo sido descrito por Cucarella et al. (2001) que a diminuição ou inativação do gene *bap* leva a uma diminuição da produção de PIA. Vale a pena ser ressaltado a cerca da etapa de desagregação, considerada a última etapa na formação de biofilmes, as células estafilocócicas podem apresentar a capacidade de

desintegrar-se da matriz formada pelo biofilme de forma a poderem passar a outros tecidos e superfícies. Desta forma, sugere-se que haja uma forma de não-expressão dos genes que contribuem para a formação do biofilme, uma vez que o processo de desintegração para infecção ou contaminação de novas superfícies pressupõe uma determinação fenotípica negativa quanto à existência de proteínas capazes de formar biofilmes (NEVES, 2012).

Pelos resultados obtidos, conclui-se que há necessidade de maior controle de qualidade na produção de alimentos minimamente processados e que a presença da bactéria do gênero *Staphylococcus* com genes que codificam para a produção de enterotoxina, pode causar intoxicações na população que consome esse tipo de alimento.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ABADIAS, M.; USALLA, J.; ANGUERAA, M.; SOLSONAA, C.; VIÑAS, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*. 123, 121–129.
- AGUILA, J.S.D.; SASAKI, F.F.; HEIFFIG, L.S.; ONGARELLI, M.G.; GALLO, C.R. (2006.) Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. *Horticultura Brasileira*, 24, 75 – 78.
- ANDREWS, W.H.; FLOWERS, J.S.; BAILEY, J.S. (2001) *Salmonella*. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. *American Public Health Association*. Washington, 4, 357-380.
- ADJRAH, Y.; KAROU, D.S., DJÉRI, B., ANANI, K., SONCY, K., AMEYAPOH, Y., SOUZA, C.; GBEASSOR, M. (2011). Hygienic quality of commonly consumed vegetables, and perception about disinfecting agents in Lomé. *International Food Research Journal*, 18, 1499-1503.
- BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. (1989) *Journal of Bacteriology*, 171, 4799-4806.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. (1989). In: *Foodborne bacterial pathogens*, 463-523.
- BONNAS, D.S. et al. (2005). Qualidade higiênico-sanitária de vegetais minimamente processados, comercializados no município de Uberlândia, MG. *Hig. Aliment.*, 19, 100-103.

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

CHITARRA MIF, CHITARRA, AB. (2005). *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2, 185-190.

CLIVER, D.O. (1994). *Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria*, 613.

CRUZ AG, CENCI AS, MAIA MCA. (2006). Pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma linha de alface minimamente processada. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 26, 104-9.

CUCARELLA, C. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation, *J. Bacteriol*. 183, 88–96.

CUCARELLA, C., TORMO, M. A., UBEDA, C., TROTONDA, M. P., MONZON, M., PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I. & PENADES, J. R. (2004). Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 72, 2177–2185.

DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, L.A.; LEWIS, K.H. (1967). Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Environ.*, 15, 1382-1387.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. (1996). *Microbiologia de Alimentos*. 43.

FRÖDER, H. et al., (2007). Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. *J. Food Prot.*, 70, 277- 1280.

GLEESON, E., & O'BEIRNE, D. (2005). Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*, 16(8), 677e685.

Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43, 1367–1378.

HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; OGAWAI, T.; ENDO, T.; EGUCHI, M. (2006). Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Scie*, 68, 165–170.

HATAKKA, M.; BJÖRKROTH, K.J.; ASPLUD, K. et al. (2000) Genotypes and enterotoxicity of isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. *J. Food Protect.*, 11, 1487-1491.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, F.E. et al. (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 426-430.

JUNG, H.J.; CHO, J.I.; PARK, S.H.; HA S.D.; LEE, K.H.; KIM, C.H.; SONG, H.S.; CHUNG, D.H.; KIM, M.G.; KIM, K.Y.; KIM, K.S. (2005). Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 134-141.

KENNEDY, J., WALL, P., M., Devoluy, M.-C., Cruveiller, P. (2007). Food Safety Handbook: Microbiological Challenges. *Bio-Mérieux Education*, 8–19.

KLOOS WE and BANNERMAN TL. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol.* 7:117–140.

KORNACKI, J.L.& JOHNSON, J.L. (2001). *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. *American Public Health Association*, 4, 69-82.

LANCETTE, G.A; BENNETT, R.W. (2001). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES , F.P; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 th ed. Washington: *American Public Health Association*, 39, 387-400.

MACK, D., ROHDE, H., DOBINSKY, S., RIEDEWALD, J., NEDELMANN, M., KNOBLOCH, J.K., ELSNER, H. & FEUCHT, H. (2000). Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infection and Immunity*, 68, 3799- 3807.

MARQUES, P.C. (2005). Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras).

MELO, L.S. (2008). Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal–UNESP.



- NEVES, T.C.C.C. (2012). Caracterização e avaliação da capacidade produtora de biofilmes em estafilococos coagulase negativos isolados de superfícies do ambiente fabril. Dissertação (Mestrado em segurança alimentar). Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica De Lisboa.
- NORMANNO, G., et al., (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol*, 115(3): p. 290-6.
- OETTERER, M. (2006). Fundamentos de ciência e tecnologia em alimentos. São Paulo: Manole.
- OLIVEIRA, M.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. (2007). Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.*, 124, 187–191.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology.*, 54, 49–79.
- PINHEIRO, N. M. S. et al. (2005). Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. *Rev. Bras. Frut.*, Jaboticabal - SP, 27, 153-156.
- RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES, A. Jr; RALL, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO, J.P.J. (2010). Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Brazilian Journal of Microbiol*, 40, 1067–1073.
- ROBBINS, R.; GOULD, S., BERGDOLL, M., (1974). Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, 28, 946-50.
- ROSEC, J.P.; GIGAUD, O.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci from foods in France. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 35, p. 213-221, 1997.
- ROSEC JP, GIGAUD O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *J Food Microbiol.* 77:61-7.
- SANTOS APR, JUNQUEIRA AMR, RESENDE A. (2005). Avaliação da contaminação microbiológica em hortaliças minimamente processadas. *Revista da Sociedade Brasileira de Horticultura.* 23:439-41.
- SASAKI, F.F.; AGUILA, J.S.D.; GALLO, C.R.; ORTEGA, E.M.M.; JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A. (2006). Alterações fisiológicas, qualitativas e microbiológicas

durante o armazenamento de abóbora minimamente processada em diferentes tipos de corte. *Horticultura Brasileira*, 24, 170 - 174.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52, n.4, p.917-924.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; VLAHOVIC, M.S. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*, 40, 175-179.

UBEDA, C., TORMO, M.A., CUCARELLA, C., TROTONDA, P., FOSTER, T.J., LASA, I., & PENADÉS, J.R. (2003). *Sip*, na integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Molecular Microbiology*, 49, 193-210.

UDO, E.E.; AL-OBAID, I.A.; JACOB, L.E; CHUGH, T. D. (1996). Molecular characterization of epidemic ciprofloxacin and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients in an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 3242-3244.

UDO, E.E. (1999). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuawait City may be a potential cause of food poisoning. *J Med Microbiol.* 48:819-23.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.*, 92, 179–185.

VERAS, J.F; CARMO, L.S; TONG, L.C; SHUPP, J.W; CUMMINGS, C; SANTOS, D.A; CERQUEIRA, M.M.O.P; CANTINI, A; NICOLI, J.R; JETT, M. (2008). A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais. Brazil. *J Infect Dis*, 12:410–415.

VUONG C., KOCIANOVA S., VOYICH J.M., YAO Y., FISCHER E.R., DELEO F.R. OTTO, M. (2004). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*, 279, 881–886.

YOUNG-HO S., JI-HYUN J., KWANG-DEOG M. (2010). Microbial evaluation of minimally processed vegetables and sprouts produced in Seoul, Korea. *Food Science and Biotechnology*. 19, 1283-1288.

## 5 REFERÊNCIAS GERAIS

- ABADIAS, M.; USALLA, J.; ANGUERAA, M.; SOLSONAA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**. v 123, p. 121–129, 2008.
- ADJRAH, Y.; KAROU, D.S., DJÉRI, B., ANANI, K., SONCY, K., AMEYAPOH, Y., SOUZA, C.; GBEASSOR, M. Hygienic quality of commonly consumed vegetables, and perception about disinfecting agents in Lomé. **International Food Research Journal** 18(4): 1499-1503. 2011
- AGUILA, J.S.D.; SASAKI, F.F.; HEIFFIG, L.S.; ONGARELLI, M.G.; GALLO, C.R. Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 75 - 78, 2006.
- ALVES, R. E.; SOUZA FILHO; M. de S. M. de; BASTOS, M. do S. R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; BORGES, M. de F. Pesquisa em Processamento Mínimo de Frutas no Brasil. In: II ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS. **Palestras, Viçosa: UFV**, p. 110, 2000.
- ANDREWS, W.H.; FLOWERS, J.S.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. **American Public Health Association**. Washington, 4<sup>th</sup> edition , p.357-380, 2001.
- BASTOS, M. S. R; ALVES, R. E; Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, Brasília : **Embrapa Hortaliças**, 123 p, 2007.
- BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 171, v. 9, p. 4799-4806, Set., 1989.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. **Bacterial foodborne pathogens**. New York: Marcel Dekker, p. 464-523, 1989.
- BEUCHAT, L.R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruit and vegetables. **Microbes and Infection**, Berlin , v.4, n.4., p.413-423, 2002.
- BRACKETT, R.E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biology and Technology**, v.15, n.3, p.305-311, 1999.

BRASIL. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispões sobre o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 de jan. 2001.

BRECHT, J.K. Physiology of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, v.30, n.1, p.18-21, 1995.

BONNAS, D.S. et al. Qualidade higiênico-sanitária de vegetais minimamente processados, comercializados no município de Uberlândia, MG. **Hig. Aliment.**, v. 19, p. 100-103, 2005.

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: 1071-1077, 2010.

CARMO, L.S. Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imunoenzimáticos. 2001. 254f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CHITARRA MIF, CHITARRA, AB. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2nd ed. Lavras (UFLA); 2005.

CLIVER, D.O. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. New York: **Marcel Dekker**, p.613,1994.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science.**, v.284, p. 1318-1322, 1999.

CRUZ AG, CENCI AS, MAIA MCA. Pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma linha de alface minimamente processada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 26(1): 104-9, 2006.

CUCARELLA, C., TORMO, M. A., UBEDA, C., TROTONDA, M. P., MONZON, M., PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I. & PENADES, J. R.. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun** 72, 2177–2185, 2004.

DOBINSKY, S.; BARTSCHT, K.; MACK, D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. **Plasmid.**, v. 47, p. 10-17, 2002.

DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, L.A.; LEWIS, K.H. Serological identification of enterotoxigenic estaphylococci from cheese. **Appl. Environ.**, v. 15, p. 1382- 1387, 1967.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167-193, 2002.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24 (2): 207–211, abr.–jun., 2004.

FERNANDEZ, M.M.; MARZI, M.C., BERGUER, P.; BURYZN, D.; LANGLEY, R.J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R.A.; MALCHIODI, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Mol. Immunol.**, v. 43, p. 927, 938, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FRÖDER, H. et al., Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. **J. Food Prot.** 70, 1277- 1280, 2007.

GALDBART, J.O. et al. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. **Journal Infection Disease.**, v. 5, p. 351-355, 2000.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 2003.

GLEESON, E., & O’BEIRNE, D. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. **Food Control**, 16(8), 677e685, 2005.

GOLDEN, D. A.; RHODEHAMEL, E. J.; KAUTTER, D. A. Growth of *Salmonella* spp in cantaloupe, watermelon, and honeydew melons. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, p. 194-196, 1993.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.N.; SANZ, J.J.; SANTOS, J.A.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M.L. Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3 degrees C. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, n.1, p.135-141, 2002.

- GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**. 43(6), 1367–1378, 2002.
- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White- Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p.26- 29, 2010.
- HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; OGAWAI, T.; ENDO, T.; EGUCHI, M. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. **J. Vet. Med. Scie**, v. 68, p. 165–170, 2006.
- HATAKKA, M.; BJÖRKROTH, K.J.; ASPLUD, K. et al. Genotypes and enterotoxicity of isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **J. Food Protect.**, v. 11, p. 1487-1491, 2000.
- IBARRA, J. A.; STEELE-MORTIMER O. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. **Cellular Microbiology**. 11(11), 1579–1586, 2009.
- JACOMINO, A.P.; ARRUDA, M.C.; MOREIRA, R.C.; KLUGE, R.A. Processamento mínimo de frutas no Brasil. In: CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, San José, Costa Rica, 2004. **Estado actual del mercado de frutos y vegetales cortados en Iberoamerica**. Sonora: CYTED, p. 79-86, 2004.
- JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 711 p., 2005.
- JOHNS, Jr M.B.; KHAN, S.A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 4033- 4039, 1988.
- JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, F.E. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 426-430, 1991.
- JUNG, H.J.; CHO, J.I.; PARK, S.H.; HA S.D.; LEE, K.H.; KIM, C.H.; SONG, H.S.; CHUNG, D.H.; KIM, M.G.; KIM, K.Y.; KIM, K.S. Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. **Korean J. Food Sci. Technol.** 37: 134-141, 2005.

KENNEDY, J., WALL, P., Food safety challenges. In: Storrs, M., Devoluy, M.-C., Cruveiller, P. (Eds.), **Food Safety Handbook: Microbiological Challenges**. Bio- Me'rieux Education, France, pp. 8–19, 2007.

Kloos WE and BANNERMAN TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin Microbiol**, Rev;7:117–140, 1994.

KORNACKI, J.L.& JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. **American Public Health Association**, Washington, 4<sup>th</sup> edition , p.69-82, 2001.

LANCETTE, G.A; BENNETT, R.W; Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES , F.P; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 th ed. Washington: American Public Health Association, cap. 39, p.387-400, 2001.

MACK, D., ROHDE, H., DOBINSKY, S., RIEDEWALD, J., NEDELMANN, M., KNOBLOCH, J.K., ELSNER, H. & FEUCHT, H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, 68, 3799- 3807, 2000.

MARQUES, P.C. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras). 2005.

MELO, L.S. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal–UNESP, 2008.

MÖLLERKE, R. O.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. Colimetrias como indicadores de qualidade de pescado artesanal do lago Guaíba, em Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 99, p. 102-106, ago. 2002.

MORETTI, C.L. Processamento mínimo de hortaliças: alternativa viável para a redução de perdas e agregação de valor ao agronegócio brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v. 17, n. 2, p.1, 1999.

MORETTI, C. L. O Segredo do Sucesso é a Qualidade. In: EMBRAPA. Iniciando um Pequeno Grande Negócio Agroindustrial: Hortaliças Minimamente Processadas. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 133p, 2003.

MORETTI, C.L. Panorama do processamento mínimo de frutas e hortaliças. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**. Brasília, cap.01, p.25-39, 2007.

NASCIMENTO, M. R.; STAMFORD, T. L. M.; Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 70, p. 32-35, mar. 2000.

NEVES, T.C.C.C. Caracterização e avaliação da capacidade produtora de biofilmes em estafilococos coagulase negativos isolados de superfícies do ambiente fabril. Dissertação (Mestrado em segurança alimentar). Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica De Lisboa. 2012.

NORMANNO, G., et al., Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **Int J Food Microbiol**, 115(3): p. 290-6, 2007.

OLIVEIRA, A. M. C.; PINTO, G. A. S.; BRUNO, L. M.; AZEVEDO, E. H. F. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de alface minimamente processada, comercializada em Fortaleza, CE. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 135, 2005.

OLIVEIRA, M. et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**., v.118, p.133-140, 2006.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review Microbiology**., v.54, p. 49–79, 2000.

PINHEIRO, N. M. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Rev. Bras. Frut.**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 153-156, abr. 2005

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES, A. Jr; RALL, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO, J.P.J. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiol**, v.40, p.1067–1073, 2010a.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES, A.J.; SOUSA, D.C.; CAMARGO, C.H.; GODINHO, N.C.; GALINDO, L.A.; SOARES, T.C.S.; ARAÚJO, J.P.J. Polymerase chain reaction



detection of enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from brazilian minas cheese. **Foodborne Pathogens**, v.7, n.9, p.1121-1123, 2010b.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 516p, 1996.

ROBBINS, R.; GOULD, S., BERGDOLL, M., Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Microbiol.**, v.28, p. 946-50, 1974.

ROSEC, J.P.; GIGAUD, O.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci from foods in France. **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 35, p. 213-221, 1997.

ROSEC JP, GIGAUD O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **J Food Microbiol.** 77:61-7, 2002.

SANTOS APR, JUNQUEIRA AMR, RESENDE A. Avaliação da contaminação microbiológica em hortaliças minimamente processadas. **Revista da Sociedade Brasileira de Horticultura**. 23:439-41, 2005.

SASAKI, F.F.; AGUILA, J.S.D.; GALLO, C.R.; ORTEGA, E.M.M.; JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A. Alterações fisiológicas, qualitativas e microbiológicas durante o armazenamento de abóbora minimamente processada em diferentes tipos de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 170 - 174, 2006.

SHAFER, W.M.; IANDOLO, J.J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infect. Immun.**, v. 20, p. 273- 278, 1978.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 13(5):1675-1683, 2008.

SILVA, N.; CATANÚSIO NETO, R.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. São Paulo: Varela, 2005.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v.9, n.1, p. 83-88, 2003.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**., Oxford, v.52, n.4, p.917-924, May 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; VLAHOVIC, M.S. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**., v. 40, p. 175-179, 2000

STEWART, C. M.; TOMPKIN, R. B.; COLE, M. B. L. R. Food safety: new concepts for the new millennium. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 105-112, 2002.

TIETJEN, M.; FUNG, D. Y. C. Salmonellae and food safety. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, n. 1, p.53-83, 1995.

TORMO, M. A., KNECHT, E., GOTZ, F., LASA, I. & PENADES, J. R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?. **Microbiology** 151,2465–2475, 2005a.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 894p, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo, 2001.

UDO, E.E.; AL-OBAID, I.A.; JACOB, L.E; CHUGH, T. D. Molecular characterization of epidemic ciprofloxacin and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients in an intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 3242-3244, 1996.

UDO, E.E. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuawait City may be a potential cause of food poisoning. **J Med Microbiol**. 48:819-23, 1999.

VANETTI, M.C.D. Segurança microbiológica em produtos minimamente processados. In: Encontro Nacional sobre processamento mínimo de frutas e hortaliças, 3, Viçosa. **Palestras, Resumos e Oficinas...** Viçosa: UFV, p.30-32, 2004.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p.179–185, 2003.

VERAS, J.F; CARMO, L.S; TONG, L.C; SHUPP, J.W; CUMMINGS, C; SANTOS, D.A; CERQUEIRA, M.M.O.P; CANTINI, A; NICOLI, J.R; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais. Brazil. **J Infect Dis**, 12:410–415, 2008.

VISSONI, C. L. Z. **Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. isoladas de carcaças de frango**. 2003. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VUONG C., KOCIANOVA S., VOYICH J.M., YAO Y., FISCHER E.R., DELEO F.R. OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **J Biol Chem**, Vol. 279, 881–886, 2004.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern? **Intern. J. Food Microbiol.**, v. 23, n. 2, p. 125-148, 1994.

WILEY, R.C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. New York: Chapman & Hall, 368p, 1994.

YOUNG-HO S., JI-HYUN J., KWANG-DEOG M. Microbial evaluation of minimally processed vegetables and sprouts produced in Seoul, Korea. **Food Science and Biotechnology**. v 19, p. 1283-1288, 2010.