Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Listeria monocytogenes em caqui (*Diospyros kaki*) nas variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte': incidência e crescimento

Cristiane Akemi Uchima

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2008

Cristiane Akemi Uchima

Bióloga

Listeria monocytogenes em caqui (*Diospyros kaki*) nas variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte': incidência e crescimento

Orientador:
Prof. Dr. **CLAUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Uchima, Cristiane Akemi
Listeria monocytogenes em caqui (*Diospyros kaki*) nas variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte': incidência e crescimento / Cristiane Akemi Uchima. - - Piracicaba, 2008.
66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactéria patogênica 2. Caqui 3. Crescimento vegetal 4. Incidência I. Título

CDD 634.451

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Paulo e Maria,

aos meus irmãos, Alexandre e Ricardo,

e ao meu noivo, Hugo,

por sempre me incentivarem e confiarem nas minhas escolhas,

pelos esforços ilimitados para minha formação pessoal e profissional.

Com amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus pais, Paulo e Maria, exemplos de simplicidade, caráter, bondade e companheirismo. Agradeço por sempre terem me dado a oportunidade de estudar, por acreditarem no meu potencial e por apoiarem as minhas escolhas. Obrigada pelo carinho! Amo vocês!

À pesquisadora científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Dra. Maria Fernanda P. P. M. de Castro, pela orientação e confiança. Agradeço por ter me incentivado e me dado a oportunidade de fazer esta pesquisa. Pela dedicação a este trabalho que possui um significado tão importante em minha vida.

Ao ITAL, especialmente à Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia e ao Grupo de Engenharia e Pós-Colheita (GEPC), pela oportunidade de estágio e realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Claudio Rosa Gallo, pela orientação e auxílio nas correções.

Ao Prof. Dr. Ernani Porto, pelas sugestões a auxílio nas correções.

À Dra. Eliane Aparecida Benato, pesquisadora científica do ITAL, pela confiança e pela oportunidade de participar de seu projeto.

Aos funcionários e aos estagiários da Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia, com carinho à Didi, e ao GEPC do ITAL, que auxiliaram na execução deste trabalho.

Aos meus irmãos Alexandre e Ricardo, meus amigos, por sempre estarem dispostos a me ensinar e a me proteger.

Ao meu noivo Hugo Shimo, também meu melhor amigo, meu companheiro. Sem você nada teria sido possível desde o início. Obrigada por incentivar os meus estudos, pelo apoio, pela compreensão e por sempre estar comigo! Agradeço pela força, pelos infinitos momentos de alegria e pelo amor compartilhado!

Ao Indy, pelos momentos de ternura.

À minha grande amiga Ana Carolina Bortolossi Rezende, pela amizade. Exemplo de garra, determinação e companheirismo. Obrigada pela ajuda durante a realização desta pesquisa e por tornar esta fase de mestranda mais divertida. Agradeço pela companhia de sempre!

À bibliotecária Beatriz Helena Giongo, pela correção deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto (processo nº 03/06445-2).

Foram muitas as pessoas que se envolveram na elaboração, execução e conclusão deste trabalho, apoiando-me, auxiliando e orientando. Gostaria de agradecer às pessoas que, injustamente, não me lembrei de colocar nesta seção.

Muito obrigada!

"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a Lua toda
Brilha, porque alta vive"

Ricardo Reis

SUMÁRIO

RESUMO..... 09
ABSTRACT..... 10
LISTA DE FIGURAS..... 11
LISTA DE TABELAS..... 13
1 INTRODUÇÃO..... 14
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 18
2.1 Considerações sobre o caqui (*Diospyros kaki*)..... 18
2.2 Importância sócio-econômica do caqui..... 19
2.3 Microrganismos patogênicos em frutas e hortaliças..... 20
2.4 *Listeria monocytogenes*..... 21
2.4.1 Patogenicidade..... 23
2.4.2 *L. monocytogenes* no ambiente..... 25
2.4.3 Incidência de *L. monocytogenes* em frutas e em suco de frutas..... 25
2.5 Métodos de detecção de *L. monocytogenes* (Bax® System)..... 27
2.6 Crescimento microbiano..... 29
2.6.1 Curvas de crescimento de *L. monocytogenes* em frutas..... 30
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 32
3.1 Incidência de *L. monocytogenes* na superfície (casca) dos caquis..... 32
3.1.1 Amostras..... 32
3.1.2 Pesquisa de *L. monocytogenes*..... 33
3.2 Curvas de crescimento de *L. monocytogenes* inoculada no caqui..... 35
3.2.1 Amostras..... 35
3.2.2 Cultura bacteriana..... 35
3.2.3 Análises de atividade de água (Aw)..... 35
3.2.4 Preparo das amostras de polpas para a curva de crescimento..... 36
3.2.5 Preparo das amostras das cascas para a curva de crescimento..... 36
3.2.6 Teste de esterilidade das polpas e das cascas..... 36
3.2.7 Preparo do inóculo, inoculação na polpa e na casca e enumeração dos patógenos..... 37

3.3 Parâmetros de crescimento..... 40
3.3.1 Cálculo do tempo de geração (g)..... 40
3.3.2 Taxa de crescimento exponencial (TCE)..... 40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 41
4.1 Incidência de *L. monocytogenes*..... 41
4.2 Avaliação da atividade de água (Aw) da polpa e da casca..... 42
4.2.1 Atividade de água da polpa..... 42
4.2.2 Atividade de água da casca..... 42
4.3 Crescimento na polpa e na casca..... 43
4.3.1 Curvas de crescimento a 10ºC..... 43
4.3.2 Curvas de crescimento a 20ºC..... 45
4.3.3 Curvas de crescimento a 30ºC..... 47
4.4 Parâmetros de crescimento..... 50
4.4.1 Tempo de geração médio (g)..... 50
4.4.2 Taxa de crescimento exponencial (log UFC/g/h)..... 52
5 CONCLUSÕES..... 53
REFERÊNCIAS..... 54
ANEXOS..... 64

RESUMO

Listeria monocytogenes em caqui (*Diospyros kaki*) nas variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte': incidência e crescimento

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que supera os 39 milhões de toneladas, com grande participação no mercado externo e crescente participação no mercado interno. Entretanto, não basta apenas ter quantidade, a qualidade e inocuidade do alimento são quesitos cada vez mais exigidos pelos consumidores. Tem-se conhecimento que produtos *in natura* podem apresentar contaminantes microbiológicos e a refrigeração é tipicamente utilizada para retardar o desenvolvimento microbiano nos produtos frescos. Microrganismos psicrotróficos, como *Listeria monocytogenes*, são capazes de se desenvolverem sob refrigeração. Esta bactéria é um importante patógeno causador de doenças transmitidas por alimentos e, devido a gravidade da doença e a elevada taxa de mortalidade em indivíduos suscetíveis, vem merecendo a atenção de microbiologistas de alimentos e profissionais da área da saúde. Nas frutas de baixa acidez, dentre as quais está o caqui (*Diospyros kaki*), *L. monocytogenes* pode ainda ter condições para sobreviver e se multiplicar, pois esta fruta não é submetida a tratamentos fitossanitários pós-colheita. Em muitos países, incluindo o Brasil, o caqui é consumido com a casca, logo, uma provável contaminação externa torna a situação ainda mais crítica com relação a inocuidade do produto. Assim sendo, este estudo teve como objetivos: (1) verificar a incidência de *L. monocytogenes* na casca de caquis (*Diospyros kaki*) 'Fuyu' e 'Rama Forte'; (2) estudar a sobrevivência e multiplicação daquele patógeno na casca e na polpa dessa fruta em diferentes tempos e temperaturas de incubação; (3) e obter parâmetros de crescimento (a duração da fase lag, o tempo de geração e a taxa de crescimento exponencial). A pesquisa de incidência de *L. monocytogenes* na superfície dos caquis foi realizada durante os meses de março a julho nos anos de 2005 e 2006. As amostras foram coletadas no comércio varejista na região de Campinas, interior do Estado de São Paulo, e no atacado, sendo o CEAGESP o local escolhido para esse último tipo de coleta. Um total de 582 frutos foram analisados pelo sistema Bax®, que é um método baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A habilidade desse patógeno se desenvolver nas duas variedades de caqui estudadas também foi verificada na polpa e na casca das frutas em diferentes tempos de incubação e a temperaturas de 10ºC, 20ºC e 30ºC. Os parâmetros de crescimento de *L. monocytogenes* (duração da fase lag, taxa de crescimento exponencial e tempo de geração) foram obtidos a partir dos dados experimentais. A pesquisa de incidência revelou ausência de *L. monocytogenes* nas cascas das frutas. Os dados de crescimento obtidos para o patógeno indicam que este pode sobreviver e se multiplicar tanto na polpa quanto na casca dos caquis 'Fuyu' e 'Rama Forte', e que a baixa temperatura pode retardar o seu crescimento, mas não evitá-lo.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; Caqui; Incidência; Crescimento

ABSTRACT

Listeria monocytogenes in 'Fuyu' and 'Rama Forte' persimmon (*Diospyros kaki*): incidence and growth

Brazil is among of the three biggest fruit producer in the world, with a production that is over 39 million tons, a relevant participation in the international market and an increasing participation in the domestic market. However, beyond quantity the quality and safety of food are issues equally demanded by consumers. It has been known that *in natura* products can contain microbiological contaminants and cooling is normally used to retard microbial development in fresh produce. Psychotrophic microorganisms, such as *Listeria monocytogenes*, are able to develop under refrigeration. This bacterium has been recognized as an important foodborne pathogen and, due to the severity of the disease and the high mortality in susceptible individuals, it has been deserving the attention of food microbiologists and health professionals. In fruits of low acidity, in which persimmon fruit is included, *L. monocytogenes* can have conditions to survive and to multiply, because it is not submitted to post harvest treatments. In many countries, including Brazil, persimmon is consumed with its skin, so an external contamination may make the situation even more critical with respect to the product safety. So the objectives of the present study were: (1) to verify the incidence of *L. monocytogenes* on the skin of 'Fuyu' and 'Rama Forte' persimmons (*Diospyros kaki*) fruits; (2) to study the survival and multiplication of that pathogen on the skin and in the pulp of this fruit at different times and temperatures of incubation; (3) to obtain kinetic values (lag phase duration, generation time and exponential growth). The incidence of *L. monocytogenes* on the skin of persimmon was verified from March to July in the years of 2005 and 2006. Samples were collected from retail in the city of Campinas, State of Sao Paulo, and from wholesale CEAGESP. A total of 582 fruits were analyzed using the Bax® System, which is a method based on Polymerase Chain Reaction (PCR). The ability of this pathogen to develop in both varieties of persimmons studied was also verified on the surface and in the pulp of the fruits at different times of incubation and at 10ºC, 20ºC and 30ºC. Kinetic values of *L. monocytogenes* (lag phase duration, generation time and exponential growth) were obtained from experimental data. The incidence survey showed the absence of *L. monocytogenes* on the skin of the fruit. The growth data showed that this pathogen can grow on the surface as well in the pulp of the 'Fuyu' and 'Rama Forte' persimmon fruits and that low temperatures can reduce the generation rate but does not inhibit its growth.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; Persimmon fruit; Incidence; Growth

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Componente do Bax®. a - termociclador. b - banho de lise..... 29

Figura 2 – Fases da curva de crescimento microbiano típico..... 30

Figura 3 – Exemplo de amostra composta..... 32

Figura 4 – Esquema da metodologia requerida pelo Bax® para *L. monocytogenes*.... 34

Figura 5 – Esquema do preparo do inóculo e inoculação na polpa e na casca do caqui..... 37

Figura 6 – Amostras das cascas com o inóculo. a - 'Rama Forte. b - 'Fuyu'..... 38

Figura 7 – Esquema das diluições a partir das amostras das polpas e da semeadura Em TSA-YE..... 39

Figura 8 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na polpa de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 10ºC..... 44

Figura 9 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na casca de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 10ºC..... 45

Figura 10 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na polpa de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 20ºC..... 46

Figura 11 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na casca de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 20ºC..... 47

Figura 12 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na polpa de caqui ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’ a 30ºC..... 48

Figura 13 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na casca de caqui ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’ a 30ºC..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção brasileira de caqui por Estado em 2005..... 19

Tabela 2 – Incidência de *L. monocytogenes* na superfície de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte', coletados no atacado e no varejo, durante os meses de março a julho, nas safras de 2005 e meses 2006..... 41

Tabela 3 – Atividade de água (Aw) da polpa dos caquis armazenados a 10ºC durante 10 dias..... 42

Tabela 4 – Atividade de água (Aw) da casca dos caquis armazenados a 10ºC durante 10 dias..... 42

Tabela 5 – Tempos de geração (h) para *L. monocytogenes* na casca e na polpa de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' incubadas a diferentes temperaturas..... 50

Tabela 6 – Taxas de crescimento exponencial (UFC/g/h) para *L. monocytogenes* na casca e na polpa de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' incubadas a diferentes temperaturas..... 52

1 INTRODUÇÃO

Levantamentos epidemiológicos a nível internacional apontam produtos de origem animal (carnes e produtos cárneos, leite e derivados, etc.) como os veículos mais freqüentes dos casos e surtos de doenças de origem alimentar. Nos Estados Unidos, as frutas e hortaliças foram o segundo veículo mais freqüente de surtos alimentares cujo agente etiológico foi identificado, de acordo com uma compilação de dados epidemiológicos realizada entre 1990 e 2003 pelo Center for Science in the Public Interest – CSPI (2004). No Brasil são escassas as informações relacionadas a alimentos contaminados e há poucos registros oficiais sobre a sua ocorrência.

Tais dados são de extrema importância para o nosso país, visto que o Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que supera os 39 milhões de toneladas. Em 2006 as exportações brasileiras de frutas frescas geraram divisas superiores à US$ 472 milhões para um volume de 802,6 mil toneladas contra US$ 119 milhões, correspondentes a 297 mil toneladas em 1998 (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF, 2007). Além de expandir as exportações, buscando novos mercados, o Brasil tem espaço para ampliar o mercado interno de frutas, visto que o consumo *per capita* é relativamente baixo quando comparado aos países desenvolvidos.

Contudo, não basta apenas ter quantidade. A prevenção da contaminação das frutas por perigos físicos, químicos e, principalmente, biológicos é um pré-requisito fundamental na garantia da segurança e da qualidade dos produtos frescos, quesitos cada vez mais exigidos pelos consumidores.

Tem-se conhecimento que produtos *in natura* podem apresentar contaminantes microbiológicos, os quais representam dois problemas importantes para a indústria de frutas e vegetais: deterioração ou redução da vida útil do alimento ou problemas de saúde pública, devido à presença e/ou crescimento de patógenos microbianos que resultam em surtos de doenças de origem alimentar (DOYLE, 1990).

A contaminação das frutas e hortaliças é preocupante, pois, anteriormente ao seu consumo, esses produtos não são submetidos a nenhum tipo de tratamento, como

o cozimento, que efetivamente destrua as células vegetativas de microrganismos patogênicos.

A refrigeração é tipicamente utilizada para retardar a respiração, a senescência, o escurecimento, a perda de umidade e o desenvolvimento microbiano nos produtos frescos (SEYMOUR; APPLETON, 2001). Entretanto, os microrganismos geralmente sobrevivem a baixas temperaturas, existindo aqueles psicrotróficos que são capazes de se desenvolver sob refrigeração, mesmo que a uma velocidade mais lenta que a da temperatura ambiente. Alguns desses microrganismos são patogênicos, tais como cepas de *Clostridium botulinum* não proteolíticas, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* (PARISH et al., 2003).

A listeriose destaca-se entre as doenças veiculadas por alimentos. É causada pela *L. monocytogenes*, a mais patogênica para o homem, devido à gravidade da manifestação clínica e pelas altas taxas de mortalidade, em torno de 30% em populações de risco (RAMASWAMY et al., 2007). Esta taxa é muito mais elevada do que as taxas de mortalidade causadas por outros patógenos de origem alimentar, como *Salmonella* Enteretidis (mortalidade de 0,38%), espécies de *Campylobacter* (0,02 a 0,1%) e espécies de *Vibrio* (0,005 a 0,01%), em termos de severidade da doença (ALTEKRUSE; COHEN; SWERDLOW, 1997; MEAD et al., 1999).

Dados dos Estados Unidos indicam que nos últimos anos está ocorrendo um declínio na incidência de infecções causadas por alguns patógenos como, por exemplo, *Campylobacter* e alguns sorovares de *Salmonella*. Entretanto, o mesmo levantamento mostra que o número de infecções causadas por *Listeria* não tem diminuído significativamente (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2004). Durante a última década, muitos esforços têm sido feitos para diminuir a contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes*. Entretanto, recentes surtos de listeriose (OKUTANI et al., 2004; OLSEN et al., 2005; ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000) indicam que tal contaminação ainda não está sob controle.

Devido à gravidade da doença e a elevada taxa de mortalidade em indivíduos suscetíveis, *L. monocytogenes* vem merecendo a atenção de microbiologistas de alimentos e profissionais da área da saúde, que têm se dedicado à elucidação dos aspectos envolvidos na doença, bem como ao controle e redução da listeriose de

origem alimentar, diminuindo, assim, os riscos à saúde do consumidor. Além disso, este microrganismo merece uma atenção especial porque é uma bactéria ubíqua, com capacidade de se desenvolver em condições inóspitas para outros microrganismos patogênicos e que pode iniciar a sua multiplicação em temperaturas que variam de 0 a 45ºC (SWAMINATHAN, 2001), sendo difícil controlar ou prevenir sua contaminação em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento, como os alimentos *in natura*.

Penteado (2003) estudou a incidência de *L. monocytogenes* em superfícies de frutas de baixa acidez (melão, melancia e mamão) e, apesar deste microrganismo não ter sido detectado em nenhuma das amostras analisadas, o autor verificou que as mesmas são bons substratos para a sobrevivência e multiplicação da bactéria.

Uma fruta, que também é de baixa acidez e que merece destaque no mercado nacional, é o caqui (*Diospyros kaki*). Em 2005, os principais produtores mundiais foram: China (1.837 mil toneladas), Japão (285 mil toneladas), Coréia do Sul (250 mil toneladas) e Brasil (150 mil toneladas) (FAO, 2007). Devido as suas características de pH, o caqui apresenta-se como um substrato potencial à sobrevivência e desenvolvimento de *L. monocytogenes*.

No Brasil são praticamente inexistentes estudos que avaliem os patógenos mais freqüentes nas frutas e estudos de seu desenvolvimento. No entanto, é um fato reconhecido que as condições higiênico-sanitárias vigentes na produção, colheita, armazenamento, transporte e distribuição nem sempre são as mais adequadas, o que teoricamente possibilitaria a proliferação dos contaminantes eventualmente presentes (PENTEADO, 2003). Observa-se a importância de estudos relativos à incidência de *L. monocytogenes* em caqui, bem como, o estudo sobre o crescimento, visto o hábito de muitos consumidores no Brasil de ingerirem caqui com casca.

Com base nessas considerações, desenvolveu-se a presente pesquisa com o objetivo de verificar a incidência de *L. monocytogenes* na superfície (casca) do caqui, no comércio varejista e no atacado, nas variedades ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’; realizar curvas de crescimento de *L. monocytogenes* nas duas variedades de caqui, na polpa e na casca, a 10, a 20 e a 30°C; obter parâmetros de crescimento, como a duração da

fase lag, o tempo de geração e a taxa de crescimento exponencial, a partir dos resultados das curvas de crescimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre o caqui (*Diospyros kaki*)

O caqui, pertencente ao gênero *Diospyros* da família botânica *Ebenaceae*, possui quatro espécies de importância comercial, dentre as quais *Diospyros kaki* é a mais importante. Esta fruta é originária da China, embora seu desenvolvimento comercial tenha se dado no Japão. Nos últimos 20 anos, houve uma expansão da produção de caqui para a Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (COLLINS; TISDELL, 1995). Sua introdução no Brasil ocorreu no final do século XIX trazido por imigrantes franceses, onde passou a ser explorado comercialmente. Tendo chegado em São Paulo em 1890, a expansão da cultura no país só ocorreu em 1920 com a chegada de imigrantes japoneses, que trouxeram outras variedades e o domínio da produção (SATO; ASSUMPÇÃO, 2002).

O caqui é uma fruta climatérica, amadurecendo, portanto, após a colheita. O caqui pode ser dividido em dois diferentes grupos: aqueles que não mudam de cor da polpa quando são polinizados, PC; aqueles que possuem a polpa clara quando sem sementes (não polinizados) e escura quando com semente (polinizados), PV. Cada um destes grupos pode ainda ser dividido em adstringente, A; e não adstringente, NA. Portanto, têm-se os grupos PCVA (‘Fuyu’, ‘Jiro’ e ‘Fuyuhana’), PCA (‘Taubaté’, ‘Hachiya’, ‘Pomelo’ e ‘Rubi’), PVNA (‘Zenjimaru’, ‘Shogatsu’ e ‘Mizushima’) e PVA (‘Aizumishirazu’, ‘Rama Forte’ e ‘Giombo’) (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993).

Entretanto, no Brasil classifica-se o fruto do caquizeiro em três grandes grupos. O primeiro é denominado “sibugaki”, que compreende as variedades de polpa sempre taninosa e de cor amarelada, quer os frutos apresentem sementes ou não. As principais variedades deste grupo são ‘Taubaté’, ‘Pomelo’, ‘Hachiya’ e ‘Coração de boi’. O segundo grupo é chamado de “amagaki”, que abrange as variedades sempre não taninosas, de polpa amarelada, tenham os frutos sementes ou não. São chamados caquis doces ou duros, como exemplo podemos citar as variedades ‘Fuyu’, ‘Jiro’, ‘Hanagosho’ e ‘Fuyuhana’. O terceiro grupo é denominado “variável”, este tipo inclui as

variedades de polpa taninosa e de cor amarelada, quando sem sementes e, não taninosa, parcial ou totalmente, quando apresentam uma ou mais sementes. Quando as sementes são numerosas a polpa é de cor escura, popularmente, denominado caqui "chocolate". Como exemplo deste grupo pode-se citar as variedades 'Rama Forte', 'Giombo' e 'Kaoru' (BENATO; SIGRIST; ROCHA, 2005; MARTINS; PEREIRA, 1989; TIBA, 1996).

2.2 Importância sócio-econômica do caqui

A cultura do caqui vem ganhando importância no Brasil, tanto pela área plantada quanto pela diversificação de regiões de plantio, o que tem aumentado as quantidades ofertadas do produto no mercado interno e, graças à organização de produtores, para a exportação.

O Brasil é o 4º produtor mundial de caqui (*Diospyros kaki*), com um valor de produção correspondente a R$ 118.394.000,00, sendo o Estado de São Paulo o maior do país. O Estado responde por aproximadamente 58% da produção nacional, atingindo em torno de 83,4 mil toneladas e 3,1 mil ha cultivados (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2005) (Tabela 1).

De acordo com a FAO (2007), de 1991 a 2005, sua produção passou de 47.662 toneladas a 150.000 toneladas (crescimento de 214,7%) e sua área colhida evoluiu de 4.059 ha a 8.500 ha (crescimento de 109,4%).

Tabela 1 – Produção brasileira de caqui por Estado em 2005

Estados	Volume (t)	Valor (R$ mil)
São Paulo	83.393	72.013
Rio Grande do Sul	28.732	19.956
Rio de Janeiro	19.040	10.058
Paraná	26.071	7.543
Minas Gerais	5.360	7.260
Santa Catarina	2.154	1.390
Bahia	60	138
Espírito Santo	39	36
Total	164.849	118.394

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.

2.3 Microrganismos patogênicos em frutas e hortaliças

Vários surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), associadas com produtos vegetais frescos ocasionadas por práticas inadequadas de manipulação foram citados por Harris et al. (2003). Sendo o caqui um fruto que, de modo geral, não é submetido a tratamentos fitossanitários em pós-colheita, os microrganismos que, de algum modo, contaminarem o fruto, ali permanecerão até o final da cadeia alimentar, com potencial de multiplicação de acordo com fatores ambientais e com o processo de amadurecimento e senescência do fruto.

Teoricamente, qualquer tipo de alimento é passível de se tornar contaminado por microrganismos patogênicos, mas isso não implica necessariamente na ocorrência de doenças humanas (BRACKETT, 1999).

No ambiente agrícola, o solo, a água, os animais e os agricultores podem contribuir de várias maneiras para a contaminação das frutas e hortaliças. Após a colheita, a água, os manipuladores e as superfícies de contato são particularmente preocupantes. A higienização pode reduzir a microbiota de frutas e hortaliças, mas a sua eficácia é limitada por diversos fatores, incluindo a irregularidade da superfície dos vegetais, a hidrofobicidade da camada de cutícula, a localização de microrganismos em estruturas protetoras e a sensibilidade dos produtos frescos a tratamentos severos. A refrigeração e o armazenamento sob atmosfera modificada retardam o desenvolvimento microbiano, mas alguns microrganismos patogênicos podem se adaptar a essas condições.

Os microrganismos patogênicos podem sobreviver nas superfícies não injuriadas das frutas e hortaliças, mas o seu desenvolvimento é incomum. Isso é parcialmente atribuído à típica incapacidade dos microrganismos patogênicos em produzir enzimas necessárias à degradação da epiderme vegetal, o que restringe a disponibilidade de nutrientes e água (HARRIS et al., 2003). Entretanto, o desenvolvimento da microbiota residente nos vegetais pode comprometer a integridade da epiderme e alterar o pH do meio, aumentando a probabilidade de sobrevivência e desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Em muitos casos a dose infectiva é relativamente baixa. Conseqüentemente, a contaminação do alimento e a sobrevivência do microrganismo

patogênico até o momento do consumo podem acarretar em doença (HARRIS et al., 2003).

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

2.4 *Listeria monocytogenes*

Taxonomicamente, o gênero *Listeria* compreende seis espécies atualmente reconhecidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (McLAUCHLIN et al., 2004). Listeriose é o nome da doença causada pelo gênero *Listeria*, e *L. monocytogenes* é a espécie mais patogênica para os animais e para o homem (McLAUCHLIN et al., 2004). Há dois relatos de casos de infecção em humanos causados por *L. ivanovii* no Reino Unido (CUMMINS; FIELDING; McLAUCHLIN, 1994; LESSING; CURTIS; BOWLER, 1994). As espécies *L. welshimeri* e *L. grayi* não estão associadas a doenças (McLAUCHLIN et al., 2004).

O gênero *Listeria* é constituído por bactérias em forma de bastonetes Gram positivos, não formador de esporos, anaeróbio facultativo e é móvel com flagelos peritríquios. Apresenta crescimento entre 2ºC a 45ºC (GANDHI; CHIKINDAS, 2007), com temperatura ótima variando entre 30ºC e 37ºC, sendo capaz de se desenvolver sob refrigeração podendo proliferar em alimentos mantidos nessas condições. A faixa de pH para seu desenvolvimento varia de 4,5 a 9,5 (FRANCO; LANDGRAF, 2006; INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF, 1996). Por ser ácido-tolerante, pode sobreviver em alimentos de baixa acidez por dias ou semanas (RYSER; DONNELLY, 2001). A atividade de água ótima para crescimento de *L. monocytogenes* é próxima de 0,97, porém, *Listeria* é um dos poucos microrganismos patogênicos que pode se multiplicar em substratos com

atividade de água tão baixa quanto 0,93 e em meio de cultura com 10% de NaCl (FARBER; COATES; DALEY, 1992; ROCOURT, 1999). Estas características associadas à capacidade de formar biofilmes tornam o gênero de especial importância para a indústria de alimentos (AGUADO; VITAS; GARCIA-JALON, 2004; DESTRO; LEITÃO; FARBER, 1996).

A bactéria é móvel a 25ºC, com movimento característico de tombamento, e é imóvel a 35ºC. Em placas contendo ágar-sangue algumas espécies, incluindo *L. monocytogenes*, produzem β-hemólise (formação de zonas claras), característica que está associada a sua patogenicidade (FARBER; PETERKIN, 1991). A multiplicação ocorre rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos utilizados na rotina laboratorial (RYSER; DONNELLY, 2001).

A multiplicação destes microrganismos é estimulada por Fe^{3+} e fenilalanina, tendo como requerimentos primários para seu desenvolvimento a glicose e glutamina, fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. A utilização de glicose em condições aeróbias resulta em produção de lactato, acetato e acetoína como produtos finais. Por serem microaeróbias ou anaeróbias facultativas, as bactérias do gênero *Listeria* também podem se desenvolver em atmosferas modificadas (ROCOURT, 1999).

Em testes bioquímicos as espécies deste gênero apresentam-se positivas para catalase, vermelho de metila, Voges Proskauer, hidrólise da esculina e do hipurato de sódio, enquanto que, as reações negativas são obtidas para oxidase, H_2S, indol, uréia, liquefação da gelatina e hidrólise da caseína (DONNELLY et al., 1992; SEELINGER; JONES, 1986;). Com respeito à fermentação de carboidratos, a utilização dos mesmos varia entre as espécies de *Listeria*. No entanto, todas as espécies fermentam a glicose sem a produção de gás (DONNELLY et al., 1992).

A espécie *L. monocytogenes* foi descrita primeiramente por Murray, Webb e Swann (1926), denominada na época de *Bacterium monocytogenes*, que foi isolada de fígado de coelho e em cobaias doentes. Em 1927, Pirie, ao isolar uma bactéria idêntica em fígado de roedores (“African jumping mouse”), passou a denominá-la *Listerella hepatolytica* e, em 1940, este mesmo pesquisador atribuiu um novo nome a esse microrganismo, o qual passou a chamar de *Listeria monocytogenes* (PIRIE, 1940 apud RYSER; DONNELLY, 2001).

L. monocytogenes pode ser dividida em subtipos por vários métodos, sendo o mais comum baseado no reconhecimento de antígenos de superfície por anticorpos específicos (FRANCO; LANDGRAF, 2006). São conhecidas 13 sorovariedades, mas somente três sorotipos (4b, 1/2a e 1/2b) são responsáveis por 89 a 96% dos casos de listeriose humana (ICMSF, 1996; TOMPIKIM, 2002), com predomínio do sorotipo 4b nos casos de doença (ZHENG; KATHARIOU, 1995). Esse sorotipo (4b) é responsável por 33 a 50% de casos esporádicos em humanos (SWAMINATHAN, 2001).

A hemolisina é o mais importante fator de virulência da *Listeria* e três espécies, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, são hemolíticas (GOUIN; MENGAUD; COSSART, 1994).

2.4.1 Patogenicidade

Apesar de diversos relatos sobre doenças indicarem que a listeriose humana já existia há muitos anos foi somente em 1929 que a *L. monocytogenes* foi isolada, pela primeira vez, por Nyfeldt, de sangue de três pacientes (RYSER; MARTH, 1991). Nos anos subseqüentes, em conseqüência de baixíssima incidência de casos, essa doença recebeu muito pouca atenção. Após 1980, em decorrência de surtos de listeriose registrados nos Estados Unidos e Europa, *L. monocytogenes* foi reconhecida como um importante microrganismo patogênico, despertando assim interesse de profissionais, tanto da área médica como também da área de pesquisa (HOF 2003; VASQUEZ-BOLAND et al., 2001). Schofield (1992) atribuiu à mudança de hábitos alimentares (novos alimentos, alimentos importados, ingestão de alimentos pouco cozidos) e à utilização de novas tecnologias de processamento de alimentos (embalagens, refrigeração) as principais causas do surgimento de patógenos alimentares psicrotróficos como *L. monocytogenes*.

Sob circunstâncias normais, qualquer pessoa pode ser infectada pelo patógeno devido ao caráter ubiquitário do agente, porém, muitas delas permanecem assintomáticas, indicando que alguns indivíduos possuem resistência imunológica à *L. monocytogenes* (BUCHRIESER et al., 2003; DOUMITH et al., 2004). Sua importância, porém, é justificada pela gravidade com que acomete populações consideradas de

risco. O tempo de incubação é relativamente longo, geralmente, excedendo 30 dias (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Trata-se de um microrganismo oportunista que afeta preferencialmente gestantes, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida ou portadores de HIV, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam comprometimento do sistema imunológico (SLUTSKER; SCHUCHAT, 1999), mas a doença pode ocasionalmente ocorrer em indivíduos não predispostos (RYSER; DONNELLY, 2001). Idosos e recém-nascidos também são suscetíveis à listeriose e enquadrados como indivíduos de alto risco (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2003). Uma boa resistência imunológica é essencial para combater a infecção por *L. monocytogenes* (BUCHRIESER et al., 2003; DOUMITH et al., 2004).

No início da infecção os sintomas da doença são semelhantes ao da gripe, acompanhado de febre, dores musculares e distúrbios gastrintestinais. Quando a infecção atinge o sistema nervoso, podem ocorrer sintomas como dor de cabeça, torcicolo, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões. Podem resultar em severas complicações como septicemia, meningite, meningocefalite e aborto (COSSART, 2007).

A septicemia ocorre geralmente sem infecção localizada, caracterizada por febre, náusea, vômito e mal estar (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001). A alta incidência de meningite e meningocefalite nos casos de infecção do sistema nervoso central justifica-se pelo tropismo pelo cérebro e medula e é acompanhado de febre alta, rigidez na nuca e desordens motoras (DOGANAY, 2003; VASQUEZ-BOLAND et al., 2001). A *L. monocytogenes* pode ainda causar infecções localizadas como conjuntivite, dermatite e linfadenite, que podem dar origem a complicações como peritonite, coledoco cistite, hepatite, pleurite, abscesso esplênico, pericardite, osteomielite e endoftalmite. Pacientes com infecção localizada geralmente são os portadores assintomáticos do patógeno (DOGANAY, 2003; VASQUEZ-BOLAND et al., 2001). Com relação às gestantes, estas não apresentam sintomas preocupantes: febre, dores de cabeça, mialgia, artralgia e mal estar. No entanto, as probabilidades de aborto e parto prematuro são grandes devido a invasão da placenta pelo patógeno, atingindo o feto, que ainda não dispõe de sistema imunológico capaz de se defender do agente (DOGANAY, 2003;

VASQUEZ-BOLAND et al., 2001). A *L. monocytogenes* é considerada a terceira causa de meningite em recém-nascidos (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Um outro tipo mais brando de listeriose é uma doença gastrintestinal autolimitada e não invasiva, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarréia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, após 12 a 24 horas de exposição (SALAMINA et al., 1996).

Segundo a literatura, quando o microrganismo está presente nos alimentos, sua concentração é geralmente baixa, cerca de 10^2 células/mL ou grama do alimento, sendo que muitas vezes, seu crescimento pode ser sobrepujado pela microflora acompanhante. Porém, quando o microrganismo encontra condições adequadas, pode atingir altos níveis (DYKES, 2003). Estima-se que, segundo estudos da dose infectante de *L. monocytogenes*, uma única bactéria seja capaz de causar doença (FAO/WHO 2001; ROCOURT et al., 2003).

2.4.2 *L. monocytogenes* no ambiente

L. monocytogenes é um microrganismo saprófito, sendo o ambiente considerado o reservatório natural para a contaminação do homem (HOFFER; PÓVOA, 1984). *L. monocytogenes* pode ser encontrada em animais domésticos e selvagens, pássaros, insetos, solo e detritos, e vegetação. Sendo encontrada em solos e vegetação, o patógeno é facilmente contraído e transmitido pelo rebanho de animais. A bactéria é geralmente isolada de gado, ovelha e aves domésticas, e também, de leite e derivados, frutas e vegetais. *L. monocytogenes* pode viver no intestino de humanos, animais e pássaros, por longos períodos sem causar infecção e tem sido encontrada em mais de 5% da população sadia, normalmente no intestino. Por esta razão, a exposição a essa bactéria é inevitável (RAMASWAMY, 2007).

2.4.3 Incidência de *L. monocytogenes* em frutas e em suco de frutas

Em virtude dos inúmeros surtos ocorridos na década de 80, *L. monocytogenes* tornou-se uma fonte de constante preocupação para as indústrias de alimentos (BRACKETT, 1988; MARTH, 1988). Segundo Roberts (1994), os alimentos são

considerados a principal fonte de *L. monocytogenes* e, quando contaminados, podem causar infecção humana. Embora o patógeno seja comumente isolado de uma variedade de vegetais crus mantidos sob refrigeração e em temperatura ambiente (HARRIS et al., 2003), a mesma associação com frutas ou vegetais ácidos é menos documentada. Não existem dados na literatura sobre a incidência de *L. monocytogenes* em caqui e, de modo geral, também são poucos os dados relativos a incidência desse patógeno em frutas.

Vahidy, Jahan e Nasim (1992) analisaram 150 amostras de frutas e vegetais frescos coletados durante um período de 12 meses de várias localidades na cidade de Karachi (Paquistão), em relação a presença de *L. monocytogenes*. O patógeno foi isolado de 2 amostras de mamão papaya (2/30), de 2 amostras de tomate (2/15), de 1 amostra de melancia (1/30) e 1 de pepino (1/15).

MacGowan et al. (1994) analisaram 822 alimentos coletados em 4 supermercados na Inglaterra, de junho de 1991 a maio de 1992. *Listeria* foi isolada em 162 amostras de frutas.

Pao, Brown e Schneider (1998) também detectaram a presença de *L. monocytogenes* na casca de laranjas quando estocadas em temperaturas maiores que 20ºC.

Sado et al. (1998) usaram “kits” rápidos para pesquisar a incidência *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, coliformes e coliformes termotolerantes, em amostras de sucos. Apenas *L. monocytogenes* foi isolada de duas entre 50 amostras de sucos: uma de suco de maçã (pH 3,78) e a outra de suco de framboesa (pH 3,75).

De maio de 1999 a fevereiro de 2000 e de abril de 2000 a janeiro de 2001, um total de 890 amostras de produtos frescos, entre eles morangos, foram obtidos de mercados noruegueses e analisados quanto a presença de bactérias coliformes termotolerantes, *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* spp. e *Yersinia enterocolítica*. Nenhuma *Salmonella* spp, nem *E. coli* O157 foi isolada. *L. monocytogenes* foi detectada em uma amostra de alface, de champignon e de morango (JOHANNESSEN; LONCAREVIC; KRUSE, 2002).

Penteado (2003) verificou a incidência de *Salmonella* spp e *Listeria* spp. na superfície de melões, melancias e mamões frescos (20 amostras/cada), coletados no atacado (60 amostras) e varejo (60 amostras) em Campinas, S.P. Brasil. *Salmonella* spp não foi detectada em nenhuma das 120 amostras analisadas, enquanto que *Listeria* spp foram detectadas em duas amostras de melancia (2/20) e uma de mamão (1/20) coletadas no atacado, e de uma amostra de melão (1/20), uma amostra de melancia (1/20) e quatro amostras de mamão (4/20) coletadas no varejo. As espécies de *Listeria* detectadas foram: *L. innocua*, *L. grayii*, *L. ivanovii* e *L. weishimeri*.

2.5 Métodos de detecção de *L. monocytogenes* (Bax® System)

Listeria pode estar no alimento em baixas concentrações, então, os protocolos de enriquecimento das amostras devem ampliar esta taxa inicial da população para níveis detectáveis (DONNELLY, 2002).

Gray et al. (1948) descreveram um dos primeiros protocolos de enriquecimento de *Listeria*. As amostras eram mantidas a frio (4ºC) em meio não-seletivo e incubadas por vários meses. Aproveitando-se da característica psicrotrófica da *Listeria*, conseguiram limitar o crescimento de organismos competidores. Embora o método de enriquecimento a frio tenha mostrado alta sensibilidade, o tempo para a obtenção dos resultados apresentou-se como um fator negativo para aplicação prática como um método de detecção (DONNELY, 1999).

L. monocytogenes pode estar injuriada no alimento devido a tratamentos como: aquecimento, congelamento, exposição a ácidos ou compostos sanitizantes (DONNELY, 2002). Os meios empregados nos Estados Unidos para a pesquisa de *L. monocytogenes* geralmente são aqueles indicados pelos protocolos do FDA (HITCHINS, 1998) e o do USDA – FSIS (JOHNSON, 1998). Muitos estudos são realizados com a finalidade de se comparar estes métodos, demonstrando que cada um possui vantagens e desvantagens conforme o alimento (DONNELY, 1999). A aplicação desses métodos convencionais apresentam dois inconvenientes: o primeiro é o tempo, pois leva-se até sete dias para identificação da *Listeria* a partir do isolamento da colônia (HITCHINS, 1998); o outro problema associado é que células de *L. monocytogenes*

injuriadas podem não se recuperar nos meios empregados, ou outras espécies de *Listeria* podem multiplicar-se mais rapidamente, sobrepondo-se à população de *L. monocytogenes*. Outros microrganismos acompanhantes podem também se multiplicar mais rapidamente que *L. monocytogenes*, interferindo na sua detecção (DONNELY, 1999). Com isso, há possibilidade de resultados falso negativos.

Devido à tolerância zero para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo em alguns países e à freqüente presença de baixas populações de *L. monocytogenes* nos alimentos em geral (ZHANG et al., 2004), o método de escolha deve ser muito sensível, capaz de detectar 1 célula/g do produto (INGIANNI et al., 2001) e apresentar alta especificidade, prevenindo a ocorrência de resultados falso positivos.

O sistema Bax®, da DuPont, divisão Qualicon, é um dos métodos que pode atender às exigências anteriores. Ele baseia-se na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é um processo enzimático, *in vitro*, para amplificação de uma seqüência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA). O sistema Bax® (Figura 1) é automatizado e permite a detecção em tempo real da presença do patógeno. Segundo a empresa responsável, os “primers” utilizados são altamente específicos para a detecção de *L. monocytogenes*, sendo baixa a possibilidade de reação cruzada com outras espécies do gênero (USER´S GUIDE, 2000).

A principal vantagem da aplicação de métodos baseados na amplificação de DNA é a estabilidade destas seqüências que não são afetadas por condições ambientais ou de cultivo.

A reação de PCR envolve três fases: (i) desnaturação do DNA, com o rompimento das pontes de hidrogênio que mantêm unidas as fitas, dando origem a duas fitas simples; (ii) anelamento ou hibridização dos “primers” (pequenas seqüências de DNA de fita simples) às regiões complementares ao DNA molde; (iii) extensão e síntese do fragmento de DNA com a adição dos desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), obedecendo o pareamento natural das bases nitrogenadas. Este ciclo formado por três fases é repetido por 20 - 40 ciclos, sendo que cada novo fragmento sintetizado serve como um molde nos ciclos subseqüentes resultando em um aumento exponencial no número de cópias da região do DNA alvo.

Segundo o fabricante, o Bax® apresenta 100% de inclusão para mais de 190 tipos de *L. monocytogenes*, excelente exclusão para mais de 50 cepas de *Listeria* (não-*monocytogenes*) e 20 tipos de outros gêneros e espécies de bactérias, sensibilidade maior ou igual a 98%, especificidade maior ou igual a 98%, taxa de falsos negativos menor ou igual a 2% e taxa de falsos positivos menor ou igual a 2%.

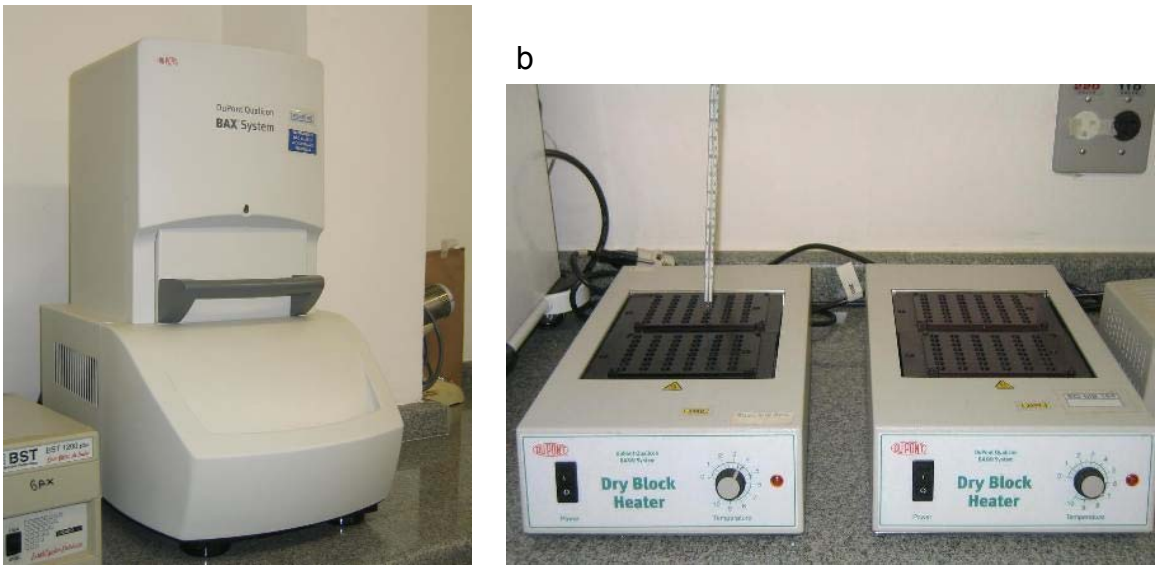


Figura 1 - Componentes do Bax®. a - termociclador. b - banho de lise celular

2.6 Crescimento microbiano

Segundo McMEEKIN et al. (1993), no mínimo quatro fases principais na história da cultura microbiana podem ser reconhecidas: a fase lag, a fase de crescimento exponencial (fase logarítmica), a fase estacionária e a fase de declínio.

A fase lag ocorre no início, nenhum aumento no número de células, aumentam de tamanho, são sintetizadas novas enzimas para as células se adaptarem ao novo meio, ou seja, quando há um ajuste da fisiologia e bioquímica das células.

A fase exponencial, ou fase log, é a fase de crescimento balanceado, ou seja, a síntese de cada componente celular (enzimas, moléculas estruturais, DNA, etc.) é ajustada para que não exista síntese além do necessário para a produção de novas células. Todo o metabolismo está direcionado para a reprodução. O tempo necessário para a população microbiana dobrar é denominado de tempo de geração.

Quando ocorre a morte celular e lise devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos no meio de crescimento, chega-se a fase estacionária. Nessa fase, a velocidade de morte celular é equivalente à velocidade de crescimento. Em condições que permitam o crescimento celular, a densidade microbiana nesta fase é tipicamente 10^9 UFC/mL.

A fase de declínio é onde há maior acúmulo de substâncias tóxicas, determinando uma velocidade de morte celular maior do que a capacidade do meio em proporcionar a reprodução ou divisão celular.

Uma curva de crescimento típica para uma cultura bacteriana é mostrada na Figura 2.

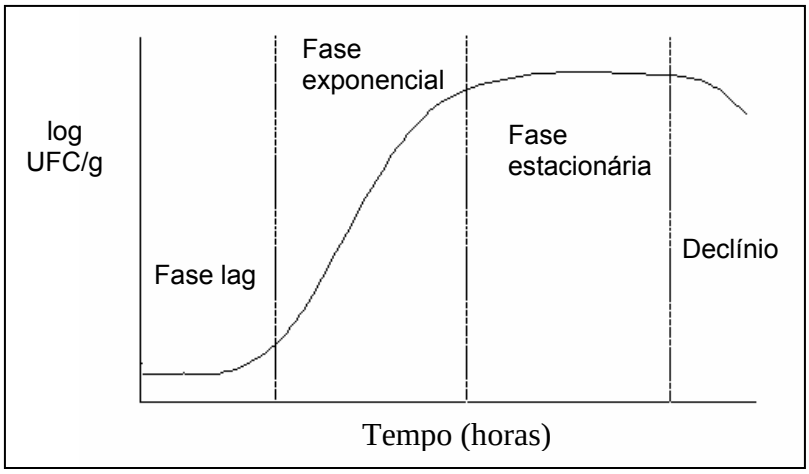


Figura 2 - Fases da curva de crescimento microbiano típico

2.6.1 Curvas de crescimento de *L. monocytogenes* em frutas

Beuchat e Brackett (1991) demonstraram o crescimento de *L. monocytogenes* em frutas ácidas, como o tomate. Demonstraram que, ao contrário de alfaces, brócolis, aspargos etc., o tomate não é um bom substrato para o crescimento de *L. monocytogenes* quando o alimento é armazenado sob refrigeração (5 a 15ºC).

Conway et al. (2000) relataram que *L. monocytogenes* pode sobreviver em maçãs fatiadas, e que a população do microrganismo aumenta quando incubada a 10 ou 20ºC (0,5% e 15% de CO_2), mas não cresce a 5ºC.

Ukuku e Fett (2002), relataram o crescimento e a sobrevivência de *L. monocytogenes* em fatias de melão fresco. O crescimento foi mais evidente em temperaturas de incubação maiores. Nas temperaturas de armazenamento correspondentes a 20ºC e a 8ºC, observaram que as fases lag duravam 4 e 6 horas, respectivamente.

Penteado (2003) estudou a capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em polpas de frutas (mamão, melão e melancia) incubadas em diferentes condições de tempo e temperatura. Concluiu que o patógeno pode multiplicar-se em frutas de baixa acidez e que baixas temperaturas não são uma barreira para o crescimento desse microrganismo, apesar de retardá-lo.

Flessa, Lusk e Harris (2005) estudaram a sobrevivência de *L. monocytogenes* na superfície de morangos inteiros e fatiados, frescos e congelados. Os resultados mostraram que o patógeno é capaz de sobreviver, porém, não é capaz de se multiplicar na superfície de frutas frescas intactas ou fatiadas, e que o microrganismo pode sobreviver em morangos congelados por pelo menos quatro semanas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises deste projeto foram realizadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), situado em Campinas, SP. A Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia e o Grupo de Engenharia e Pós-Colheita (GEPC) foram os departamentos que cederam o local e os equipamentos para as análises.

3.1 Incidência de *L. monocytogenes* na superfície (casca) dos caquis

3.1.1 Amostras

Os caquis ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’, foram coletados no comércio varejista na região de Campinas, SP, e no atacado, sendo o CEAGESP o local escolhido para esse último tipo de coleta. As coletas foram realizadas durante a safra do caqui, que se inicia em março estendendo-se até julho.

Para essa análise optou-se por formar amostras compostas, ou seja, um conjunto de três a oito frutos corresponderia a uma amostra representativa de um local de coleta (Figura 3).

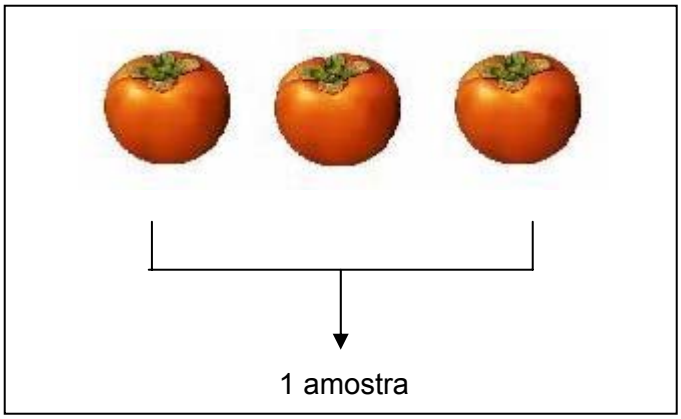


Figura 3 - Exemplo de amostra composta

3.1.2 Pesquisa de *L. monocytogenes*

Para a detecção de *L. monocytogenes* na superfície do caqui, foi utilizado o sistema Bax®, que é um método de detecção rápido de microrganismos patogênicos e que está baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Primeiramente, swabs foram aplicados com pressão sobre os caquis, certificando-se que o algodão entrasse em contato com toda a superfície do fruto (os swabs foram previamente umedecidos com água peptonada estéril 0,1%). Três a oito swabs (um swab/fruto) foram reunidos em único tubo estéril contendo 9 mL do diluente (H_2O p 0,1%) originando uma das amostras compostas. O tubo foi homogeneizado e o seu conteúdo foi adicionado na bolsa plástica contendo o caldo de enriquecimento primário, caldo Demi Fraser (Acumedia), na proporção 1:10. Esse caldo teve por finalidade recuperar as células injuriadas, supondo a presença do microrganismo em questão. As amostras foram incubadas a 30ºC por 24 horas.

A *Listeria* requer um enriquecimento secundário no Caldo MOPS-BLEB. Passado o período de incubação, foi feita uma diluição de 1:100, adicionando 100 µL do caldo de enriquecimento primário (Demi Fraser) à 9,9 mL do MOPS-BLEB, incubando-se a amostra a 35ºC por 24 horas.

Após o tempo de incubação no caldo de enriquecimento secundário, 5 µL foram adicionados em tubos contendo tampão de lise. As reações de lise para *Listeria* foram feitas a 55ºC por 60 minutos. Logo em seguida, os tubos contendo as amostras foram aquecidos a 95ºC por mais 10 minutos e, então, resfriados a 2ºC a 8ºC por 5 minutos. Destes, foram adicionados 50 µL em tubos de PCR contendo os reagentes necessários para amplificação do DNA (target), mais o corante fluorescente “SYBR Green”. Assim, as amostras foram colocadas no termociclador/detector onde o DNA alvo, após 38 ciclos de amplificação, gerou um sinal fluorescente, automaticamente para determinação do resultado.

O esquema utilizado para a pesquisa de *L. monocytogenes* encontra-se na Figura 4.

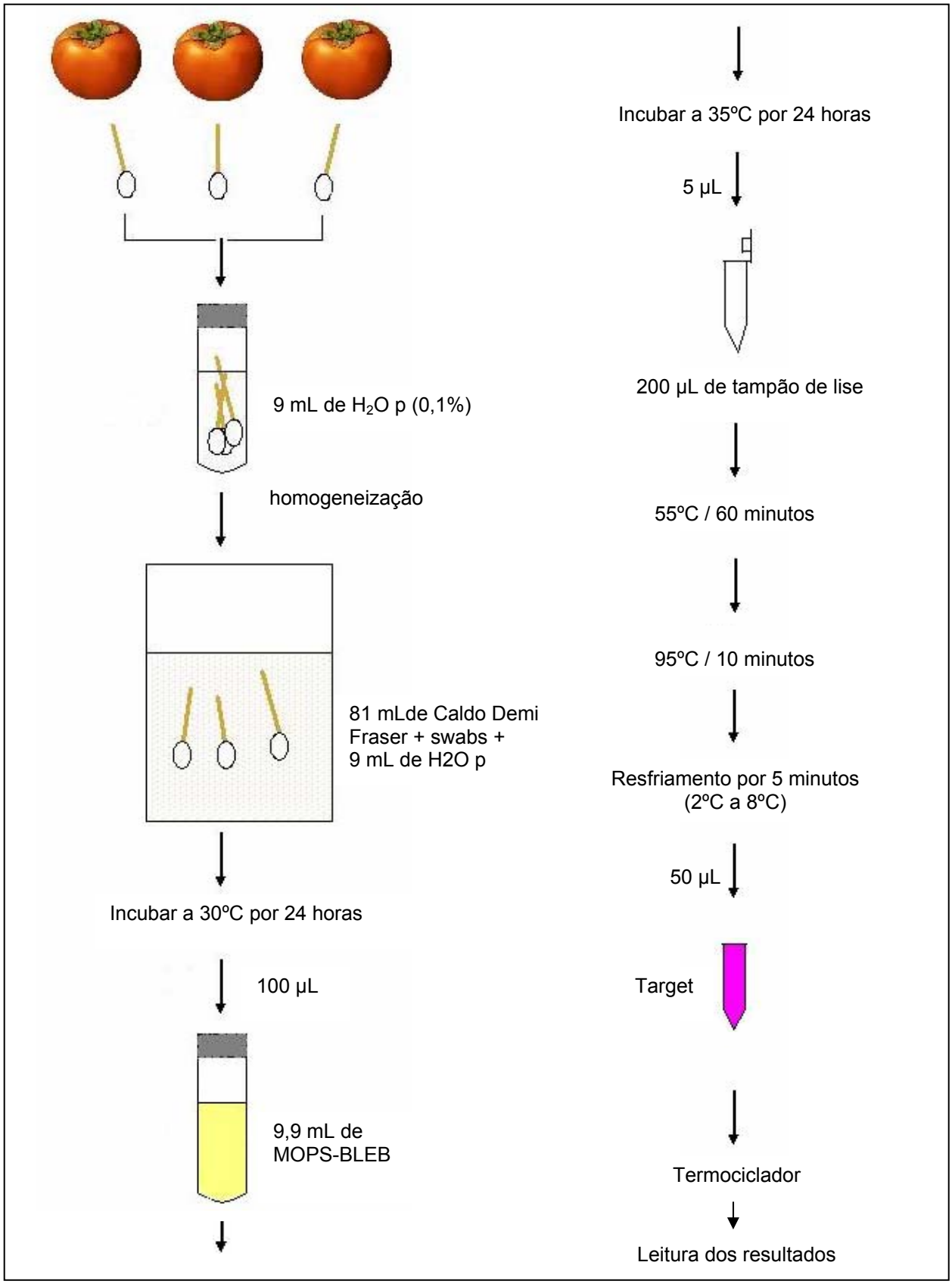


Figura 4 - Esquema da metodologia requerida pelo Bax® para *L. monocytogenes*

3.2 Curvas de crescimento de *L. monocytogenes*

A metodologia utilizada nesta pesquisa baseou-se no trabalho realizado por Penteado (2003).

3.2.1 Amostras

Para a realização das curvas de crescimento foram utilizados caquis das variedades ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’ obtidos do comércio varejista na região de Campinas, SP. Ressalta-se que foram tomados os cuidados de selecioná-los no mesmo período de maturação e sem nenhum dano físico.

3.2.2 Cultura bacteriana

A cepa padrão de *L. monocytogenes* (IAL 2368 – Instituto Adolfo Lutz) foi obtida a partir da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, situado em Campinas, SP. A cultura foi mantida em tubos de ágar tripticase de soja acrescidos de extrato de levedura a 0,6% (TSA-YE)(TSA, Acumedia; YE, Oxoid) sob refrigeração após ter sua identidade confirmada por testes bioquímicos: teste de catalase, teste de motilidade e reação em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). Além destes, foram utilizados a coloração de Gram, o *Kit* Api *Listeria* (bioMérieux), o qual consiste em uma galeria com 10 provas bioquímicas, seguindo as instruções do fabricante, e o sistema Bax®.

3.2.3 Análises de atividade de água (Aw)

Amostras controle das polpas e das cascas dos caquis ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’, foram submetidas às análises de Aw (Aqualab®, Decagon) durante o período de armazenamento a 10ºC, a mais longa dos experimentos. Com isso, monitorou-se a variação da Aw das amostras no decorrer dos dias.

3.2.4 Preparo das amostras de polpas para a curva de crescimento

Os caquis foram lavados em água corrente com detergente neutro e uma esponja limpa durante, aproximadamente, três minutos, até a retirada de toda sujidade. Em seguida, foram imersos em um recipiente contendo solução de hipoclorito de sódio 150 mg.L por 15 minutos. Após o tempo determinado, os caquis foram retirados da solução e deixados secar dentro do fluxo laminar (Pachane, PA 100). Assepticamente, foram retiradas, com auxílio de estiletes e espátulas, porções das polpas sem sementes, que foram transferidas para bolsas plásticas para que fosse feita a homogeneização no “shaker” e, depois, estas bolsas foram armazenadas sob congelamento. Um dia antes da realização da curva de crescimento, as bolsas foram retiradas do freezer e, assepticamente, foram retiradas porções de 1 g da polpa do caqui e colocadas em tubos de ensaio estéreis com rosca e armazenadas na geladeira.

3.2.5 Preparo das amostras de cascas para a curva de crescimento

Para o preparo das amostras de cascas, os caquis foram submetidos ao mesmo processo de remoção de sujidades descritos no item anterior: lavagem com detergente e imersão em solução de hipoclorito de sódio. A diferença foi que, assepticamente, foram retiradas amostras de 2 g da casca do caqui, com auxílio de estiletes e pinças, que foram transferidas para placas de Petri estéreis e armazenadas na geladeira um dia antes da análise.

3.2.6 Teste de esterilidade das polpas e das cascas

Para o teste de esterilidade, amostras das polpas e das cascas do caqui sem o inóculo da bactéria serviram como controle no início e durante a realização de cada curva de crescimento. Estas amostras foram diluídas em 9 mL água peptonada (0,1%) estéril e, após homogeneização, 1 mL da amostra foi inoculada em profundidade nas placas que foram cobertas com ágar padrão para contagem (PCA, Acumedia) e incubadas a 35ºC por 48 horas.

3.2.7 Preparo do inóculo, inoculação na polpa e na casca e enumeração dos patógenos

A cepa padrão de *L. monocytogenes* foi reativada através de três transferências sucessivas em TSA-YE, com incubação a 30ºC por 24 horas, imediatamente antes do início do experimento.

Uma alçada do terceiro tubo de TSA-YE foi transferida para 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%, Oxoid) para ajustar a concentração de 10^8 UFC/mL, correspondente a escala 1, usando o equipamento Densimat (bioMérieux). A suspensão foi diluída em série (1:10) em água peptonada (0,1%) estéril até que alcançasse a concentração de 10^4 UFC/mL. Foram inoculados 10 µL (10^2 UFC) da suspensão de *L. monocytogenes* em 1 g da polpa de caqui, previamente colocado em tubos estéreis (Figura 5) e em 2 g da casca contida no interior das placas de Petri (Figuras 5 e 6), sempre em duplicata.

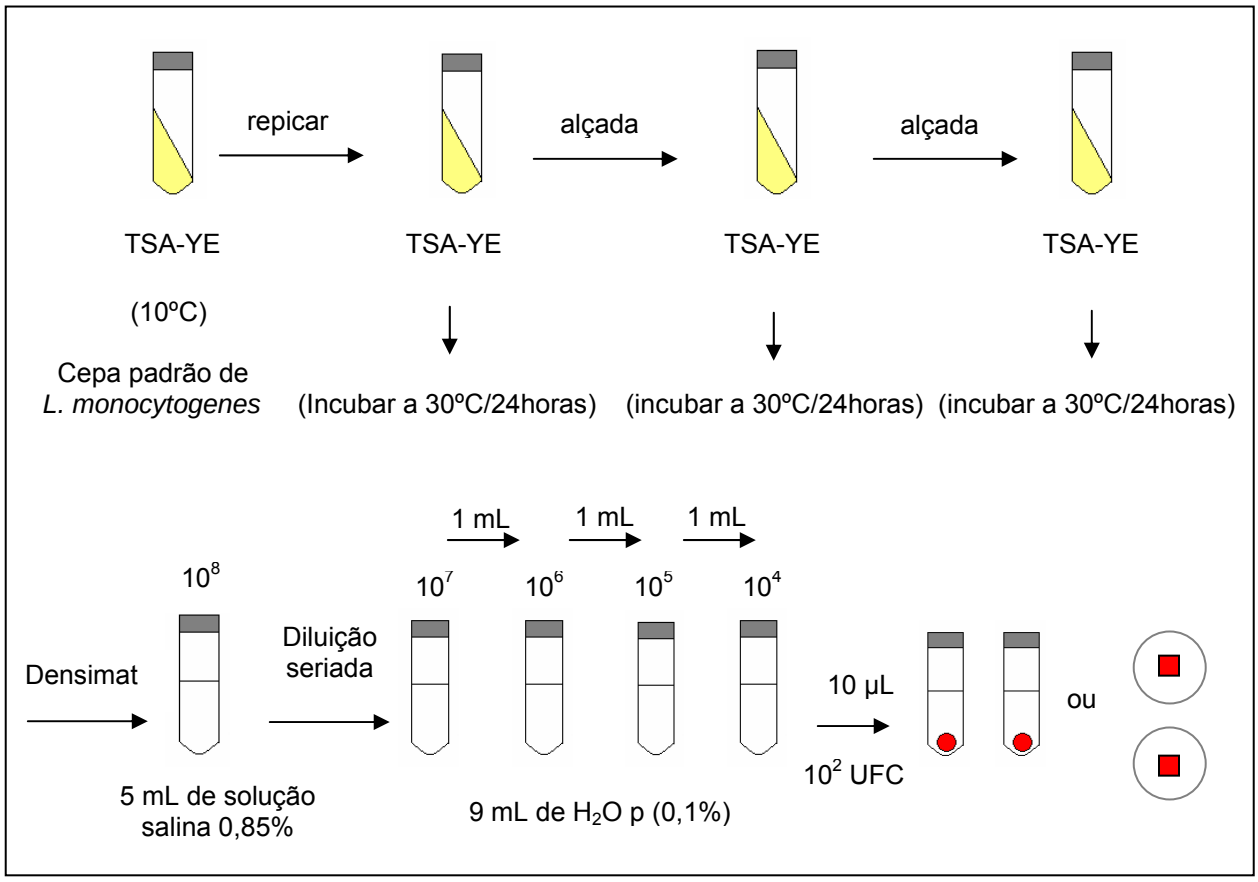
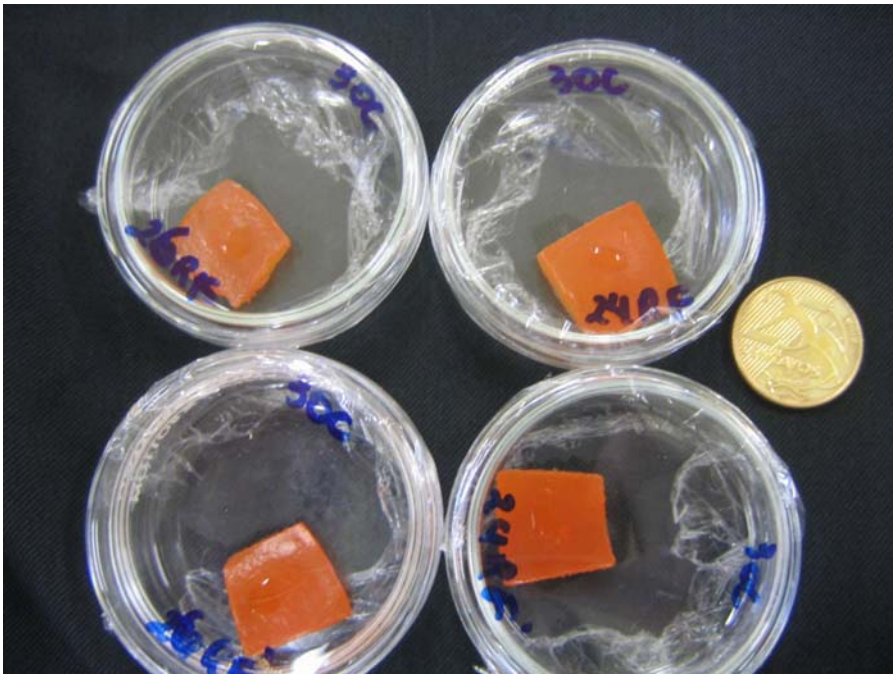


Figura 5 - Esquema do preparo do inóculo e inoculação na polpa e na casca do caqui

a



b

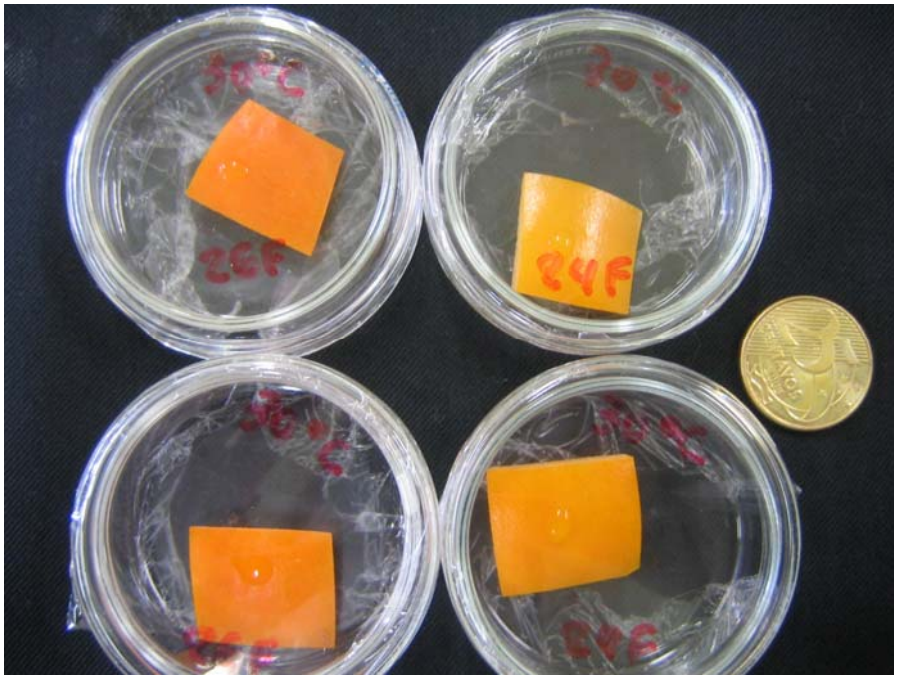


Figura 6 - Amostras das cascas com o inóculo. a - ‘Rama Forte’. b - ‘Fuyu’

Os tubos de ensaio e as placas de Petri contendo as amostras das polpas e das cascas do caqui inoculadas, respectivamente, foram incubados a:

- 10ºC por 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas;
- 20ºC por 0, 4, 8, 10, 12, 14, 17, 24, 36, 41 e 48 horas;
- 30ºC por 0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24 e 26 horas.

Após cada período de incubação, a cada tubo foram adicionados 9 mL de água peptonada (0,1%) estéril, e cada amostra das cascas foi transferidas para pequenas bolsas estéreis e acrescidas de 18 mL de água peptonada (0,1%) estéril, para que fossem feitas a homogeneização e as diluições seriadas (1:10) subseqüentes. A semeadura foi feita em superfície, em placas (duplicatas) contendo ágar TSA-YE e espalhadas com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 30ºC por 24 horas (Figura 7). A contagem das colônias foi feita com a ajuda de um contador de colônias, sendo os resultados expressos em UFC/g. Foram realizadas três repetições para cada curva de crescimento.

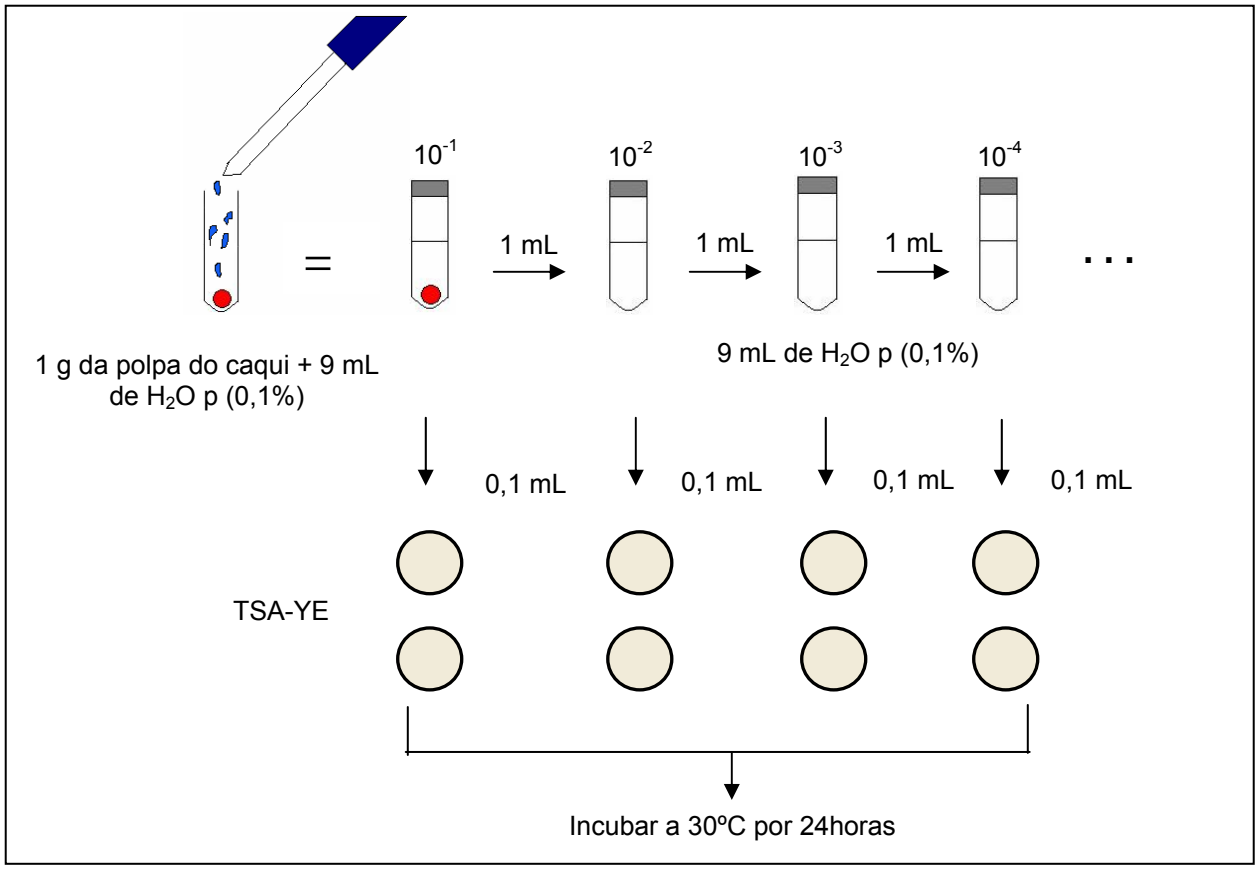


Figura 7 - Esquema das diluições a partir das amostras das polpas e da semeadura em TSA-YE

3.3 Parâmetros de crescimento

Os parâmetros de crescimento de *L. monocytogenes* na casca e na polpa das duas variedades de caqui estudadas foram obtidos através do tempo de geração (g) e da taxa de crescimento exponencial (TCE). Os parâmetros de crescimento obtidos foram comparados utilizando o procedimento de comparação pareada de Tukey.

3.3.1 Cálculo do tempo de geração (g)

É o intervalo de tempo necessário para que uma célula se divida ou para que a população duplique. O tempo de geração (g) foi calculado a partir da inclinação da reta obtida na faixa de crescimento exponencial. A seguinte equação foi utilizada g = 0.301/inclinação como descrito por Madigan, Martinko e Parker (1997).

3.3.2 Taxa de crescimento exponencial (TCE)

O valor da taxa de crescimento exponencial (TCE) foi a inclinação da reta utilizada no cálculo do tempo de geração como descrito no item anterior.

4 RESULTADOS

4.1 Incidência de *L. monocytogenes*

Pela Tabela 2 observa-se que não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das 582 frutas analisadas.

Tabela 2 - Incidência de *L. monocytogenes* na superfície de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte', coletados no atacado e no varejo, durante os meses de março a julho, nas safras de 2005 e 2006

Variedades de caqui	Varejo			Atacado			Total		
	número de frutas	n[1]	%	número de frutas	n[1]	%	número de frutas	n[1]	%
'Fuyu'	154	0	0	133	0	0	287	0	0
'Rama	161	0	0	134	0	0	295	0	0

Forte’									
Total	315	0	0	267	0	0	582	0	0

(n1) número de amostras positivas

Não existem dados na literatura sobre a incidência deste patógeno em caqui e, de modo geral, também são poucos os dados relativos à incidência desse microrganismo em frutas. Entretanto, dependendo das condições sanitárias durante o crescimento no campo, colheita e comercialização dos frutos, a contaminação pode ocorrer. O manuseio cuidadoso da fruta durante todo seu processo, desde a produção até a mesa do consumidor, é um aspecto importante para preservar a sua qualidade. Sendo o caqui um fruto que, de modo geral, não é submetido a tratamentos fitossanitários em pós-colheita, os microrganismos que, de algum modo, contaminarem o fruto, ali permanecerão até o final da cadeia alimentar, com potencial de multiplicação e, dependendo do número de células do patógeno presentes, a ingestão dessas frutas pode provocar desde uma simples gastroenterite a sérios problemas, podendo ocasionar a morte.

4.2 Avaliação da atividade de água (Aw) da polpa e da casca

4.2.1 Atividade de água da polpa

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para a verificação da Aw da polpa armazenada a 10ºC.

Tabela 3 - Atividade de água (Aw) da polpa dos caquis armazenados a 10ºC durante 10 dias

Variedade de caqui	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia
‘Fuyu’	0,981	0,981	0,981	0,981	0,980	0,980	0,979	0,979	0,979	0,978
‘Rama Forte’	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,990	0,990	0,989	0,989	0,989

A diferença observada na Aw da variedade ‘Fuyu’ entre o primeiro e o décimo dia foi de 0,003, enquanto que a diferença observada para a variedade ‘Rama Forte’ foi de 0,002. Assim, as diferenças verificadas não podem ser consideradas como um fator de interferência para o crescimento de *L. monocytogenes* na polpa dos caquis. A média da Aw para ‘Fuyu’ foi de 0,979 e 0,990 para a variedade ‘Rama Forte’.

4.2.1 Atividade de água da casca

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para a verificação da Aw da casca armazenada a 10ºC.

Tabela 4 - Atividade de água (Aw) da casca dos caquis armazenados a 10ºC durante 10 dias

Variedade de caqui	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia
‘Fuyu’	0,977	0,977	0,977	0,976	0,974	0,974	0,972	0,970	0,970	0,968
‘Rama Forte’	0,972	0,972	0,971	0,971	0,971	0,970	0,968	0,965	0,965	0,963

De acordo com a Tabela 4, praticamente não houve alteração da Aw da casca entre o primeiro e o décimo dia de armazenamento, o que não interferiu no crescimento de *L. monocytogenes* na casca armazenada a 10ºC. A diferença observada na Aw das variedades ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’ entre o primeiro e o décimo dia de armazenamento foi de apenas 0,009. A média da Aw para ‘Fuyu’ foi de 0,973 e 0,968 para a variedade ‘Rama Forte’.

4.3 Crescimento na polpa e na casca

O pH das variedades de caqui estudadas, determinado previamente por Muñoz (2002), foi de 6,3 e 5,5, respectivamente para ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’. O monitoramento da atividade de água durante o experimento indicou que praticamente não houve variações nesse fator. Portanto, nenhum desses fatores se constitui em uma barreira ao crescimento de *L. monocytogenes*, pois a faixa de pH para seu desenvolvimento

varia de 4,5 a 9,5 (FRANCO; LANDGRAF, 2006; ICMSF, 1996) e a Aw ótima para seu crescimento é próxima de 0,97.

O procedimento aplicado para esterilização superficial do fruto e remoção asséptica da casca e da polpa foram adequados. Todas as análises das amostras controle não inoculadas realizadas inicialmente e durante o período de incubação revelaram a ausência de *Listeria* ou de alguma microflora endógena nos tecidos internos e na casca da fruta. Samish, Tulczynska e Bick (1963) mencionaram que assume-se que, em frutas sadias, a microbiota esteja limitada a superfície, enquanto que o tecido mais interno permanece estéril.

4.3.1 Curvas de crescimento a 10ºC

A Figura 8 mostra a curva de crescimento para *L. monocytogenes* a 10ºC na polpa de caqui das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte'.

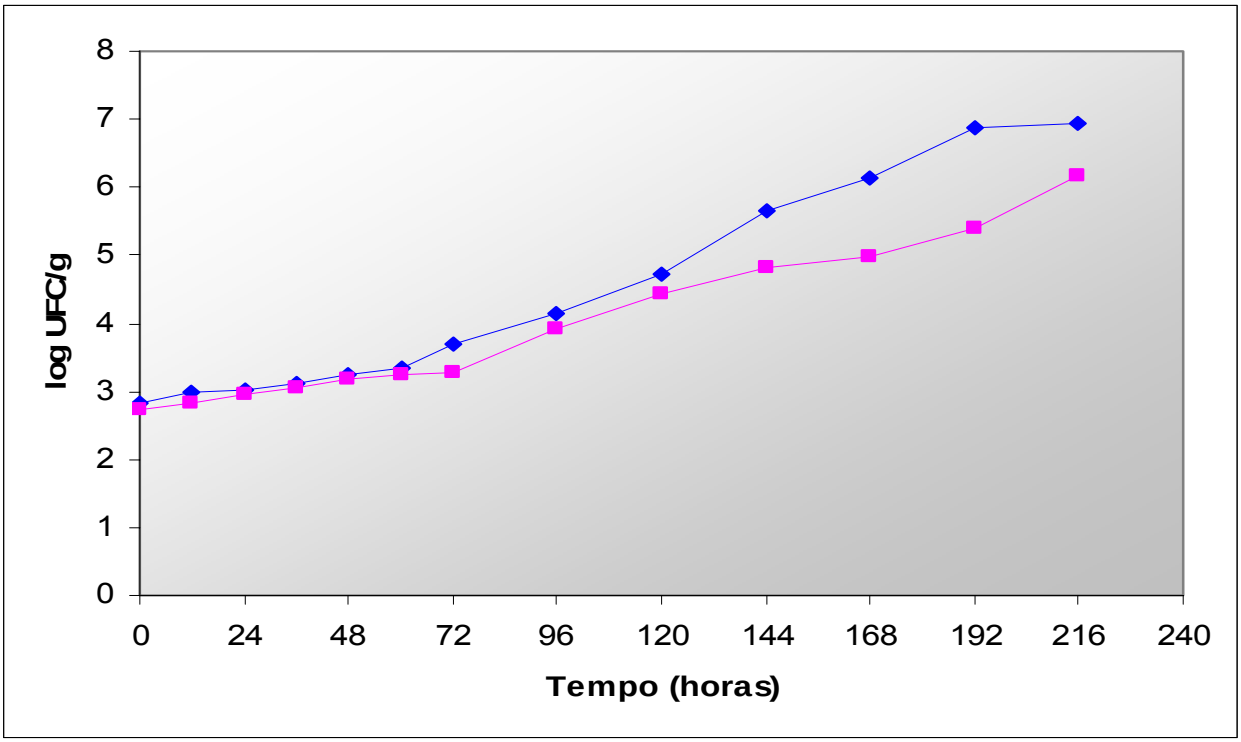


Figura 8 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na polpa de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 10ºC. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (♦ 'Fuyu', ■ 'Rama Forte')

Na temperatura de 10ºC, na polpa, uma fase lag de cerca de 72 horas pode ser observada nas duas variedades estudadas. Observou-se um aumento de 4,1 ciclos log após 216 horas de incubação para a variedade 'Fuyu', o que corresponde a uma população máxima de 6,94 log UFC/g. Para a variedade 'Rama Forte', um aumento máximo de 3,4 ciclos log foi verificado após 216 horas, atingindo uma população de 6,18 log UFC/g.

A Figura 9 mostra a curva de crescimento para *L. monocytogenes* a 10ºC na casca de caqui das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte'.

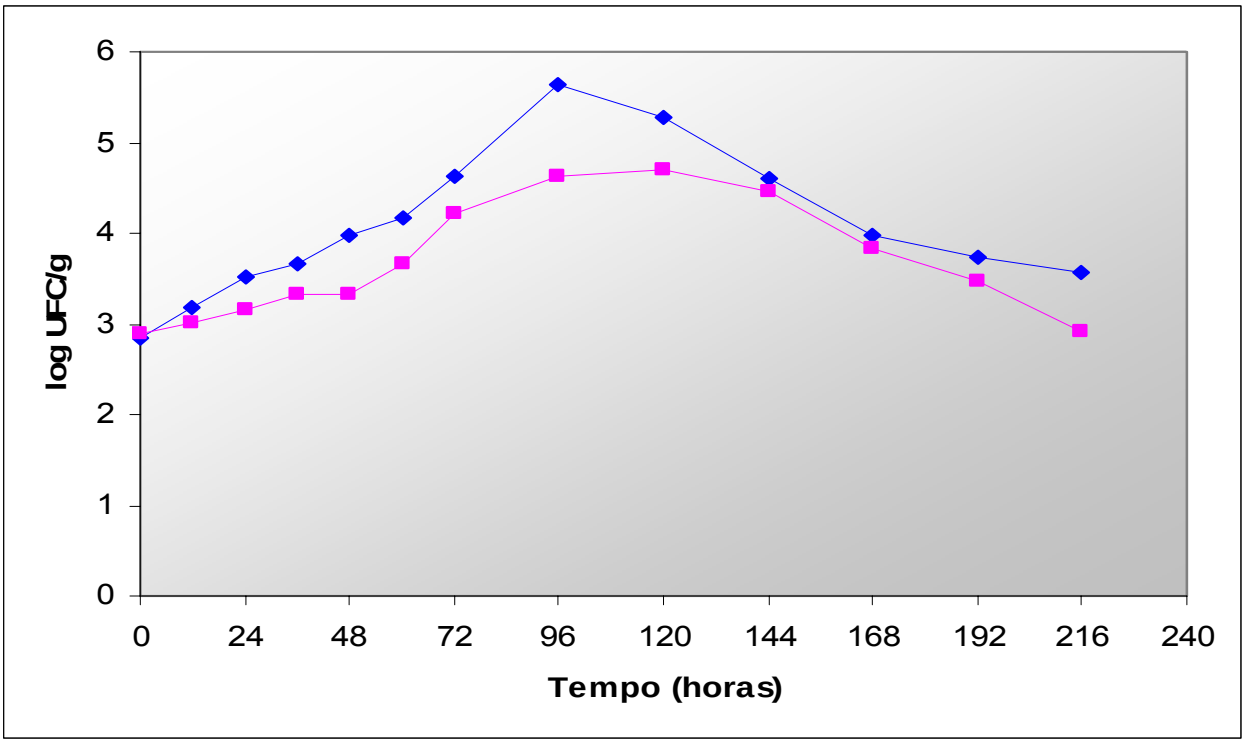


Figura 9 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na casca de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 10ºC. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (♦ 'Fuyu', ■ 'Rama Forte')

A 10ºC, na casca, para a variedade 'Fuyu' não se verificou uma fase lag de *L. monocytogenes* definida antes que um crescimento mais intenso fosse observado. Para a variedade 'Rama Forte', verificou-se que a fase lag teve duração de, aproximadamente, 48 horas. Um aumento máximo de 2,8 ciclos log foi verificado para a variedade 'Fuyu' após 96 horas de incubação, atingindo uma população máxima de 5,63 log UFC/g. Para a variedade 'Rama Forte', um aumento máximo de 1,8 ciclos log

foi verificado somente após 120 horas, atingindo uma população máxima de 4,69 log UFC/g.

4.3.2 Curvas de crescimento a 20ºC

A Figura 10 mostra a curva de crescimento para *L. monocytogenes* a 20ºC na polpa de caqui das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte'.

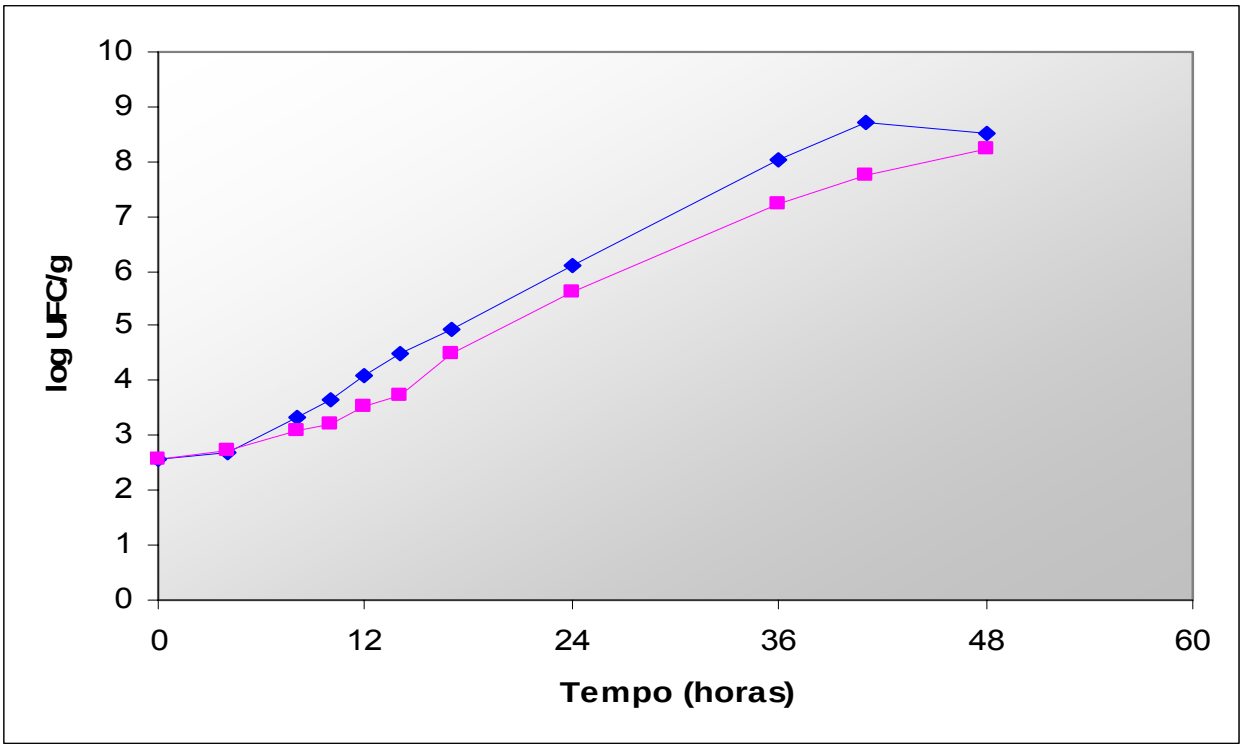


Figura 10 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na polpa de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 20ºC. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (♦ 'Fuyu', ■ 'Rama Forte')

Na polpa, a 20ºC, verificou-se que a fase lag de *L. monocytogenes* foi de aproximadamente 4 horas, para as duas variedades estudadas. Observou-se um aumento de 6,1 ciclos log para a variedade 'Fuyu' após 42 horas, correspondendo a uma população de 8,72 log UFC/g. Para a variedade 'Rama Forte', um aumento máximo de 5,7 ciclos log pode ser verificado após 48 horas, atingindo uma população próxima de 8,24 log UFC/g.

A Figura 11 mostra a curva de crescimento para *L. monocytogenes* a 20ºC na casca de caqui das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte'.

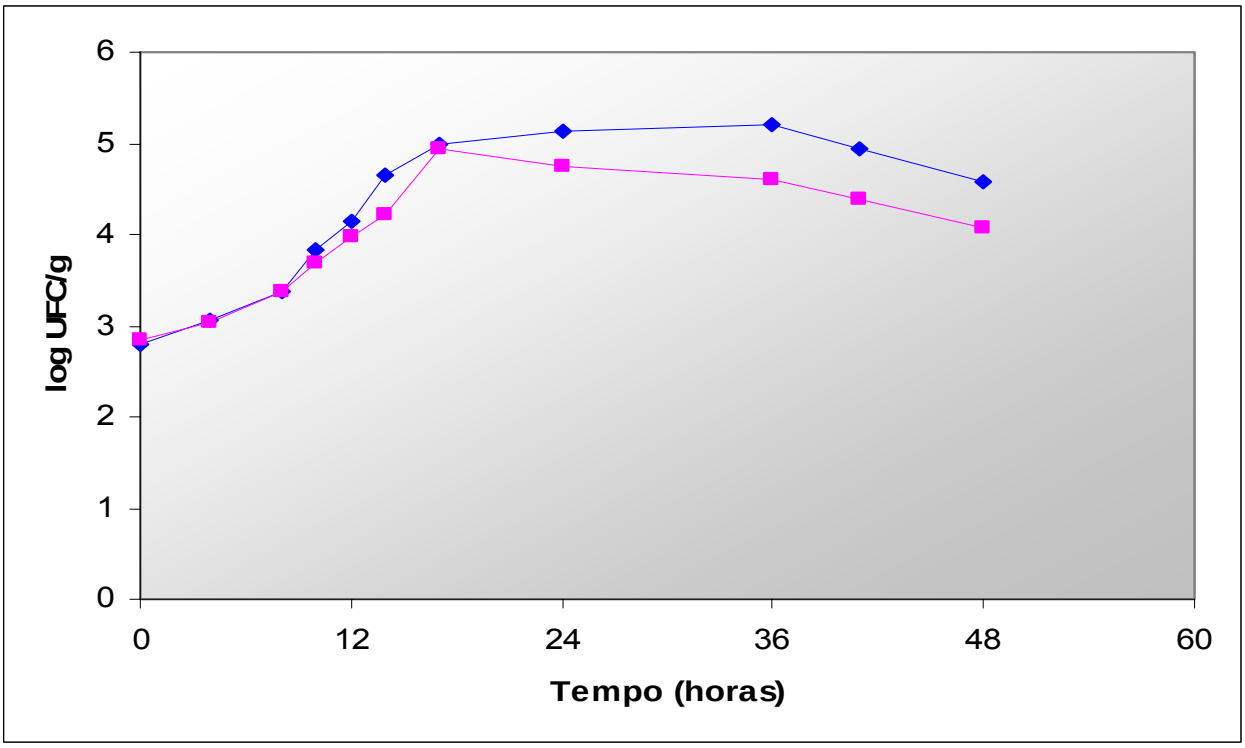


Figura 11 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na casca de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 20ºC. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (♦ 'Fuyu', ■ 'Rama Forte')

A 20ºC, na casca, verificou-se que a fase lag de *L. monocytogenes* foi de aproximadamente 4 horas, para as duas variedades estudadas. Na casca, um aumento máximo de cerca de 2,4 ciclos log foi atingido em 36 horas para a variedade 'Fuyu', correspondendo a uma população de 5,20 log UFC/g. Para a variedade 'Rama Forte', após 17 horas observou-se um aumento de 2,1 ciclos log, atingindo populações de 4,95 UFC/g.

4.3.3 Curvas de crescimento a 30ºC

A Figura 12 mostra a curva de crescimento para *L. monocytogenes* a 30ºC na polpa de caqui das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte'.

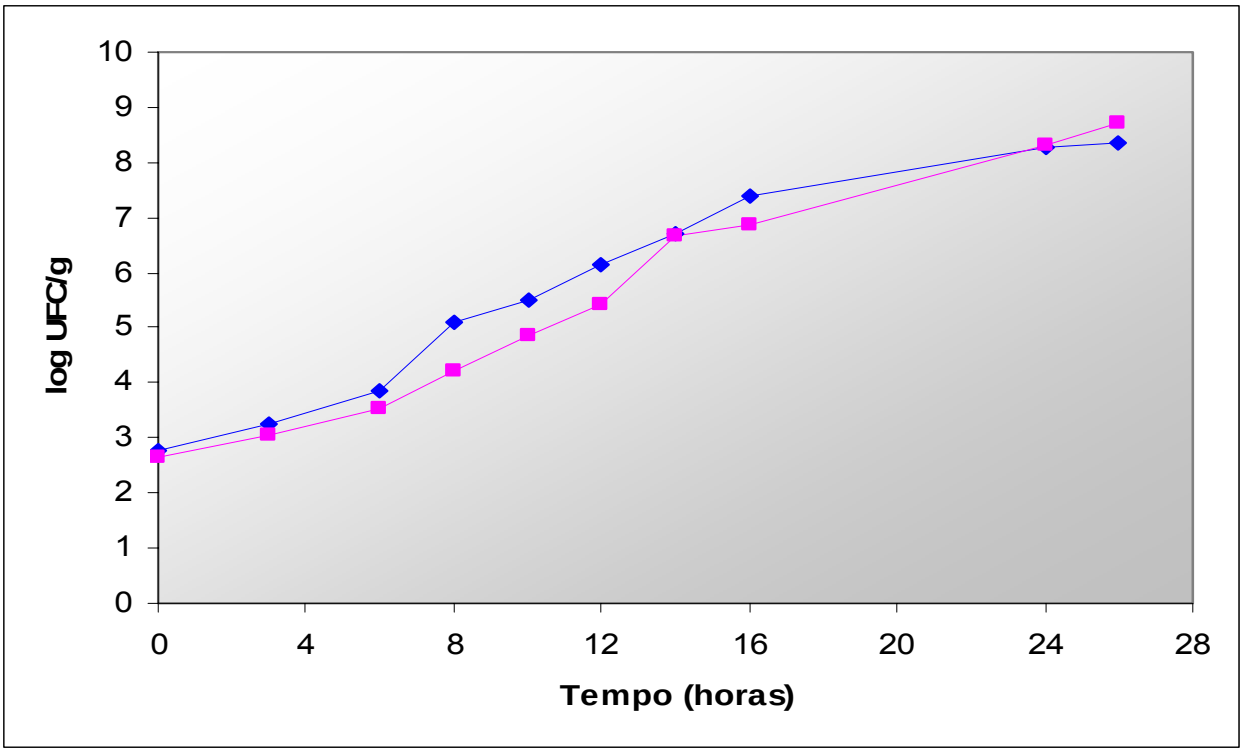


Figura 12 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na polpa de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 30ºC. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (♦ 'Fuyu', ■ 'Rama Forte')

Sob temperatura de 30ºC, na polpa, não se verificou uma fase lag definida. Observou-se que houve aumento de 5,6 ciclos log após 26 horas para a variedade 'Fuyu', correspondendo a uma população em torno de 8,34 log UFC/g. Para a variedade 'Rama Forte', verificou-se um aumento de 6,1 ciclos log após 26 horas, atingindo uma população correspondente a 8,72 log UFC/g.

A Figura 13 mostra a curva de crescimento para *L. monocytogenes* a 30ºC na casca de caqui das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte'.

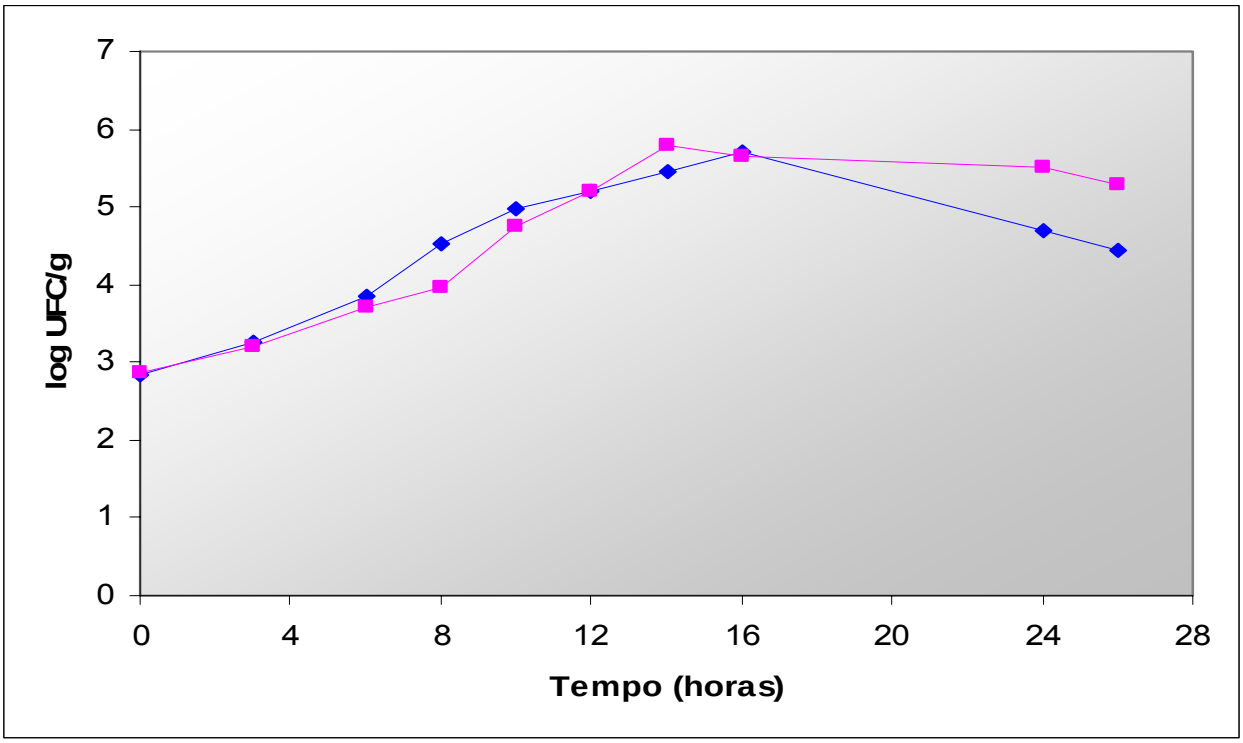


Figura 13 – Crescimento de *L. monocytogenes* (log UFC/g) na casca de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 30ºC. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (♦ 'Fuyu', ■ 'Rama Forte')

Na casca, a 30ºC, verificou-se também que a fase lag de *L. monocytogenes* não é definida. Um aumento máximo de cerca de 2,9 ciclos log foi verificado, após aproximadamente 16 e 14 horas, respectivamente para 'Fuyu' e 'Rama Forte'. As populações máximas atingidas foram de 5,7 log UFC/g para 'Fuyu' e 5,85 log UFC/g para 'Rama Forte'.

As curvas de crescimento possibilitaram verificar o comportamento de *L. monocytogenes* na polpa e na casca das variedades de caqui estudadas em diferentes condições de temperatura e tempos de incubação. Verificou-se que o microrganismo tem condições de crescer tanto na polpa quanto na casca do caqui, de ambas variedades, 'Fuyu' e 'Rama Forte', a diferentes temperaturas. A 10ºC, tanto na casca quanto na polpa, verificou-se que na variedade 'Fuyu' maiores populações foram atingidas em relação à 'Rama Forte' e essa diferença pode estar relacionada com o fato do pH da variedade 'Fuyu' (pH 6,3) ser mais favorável para o crescimento da bactéria nesta temperatura. À 20ºC e à 30ºC praticamente não houve grandes variações na

contagem entre as variedades no mesmo substrato, e exceto pela curva de 30ºC da polpa de 'Fuyu', há um aumento das populações conforme a temperatura aumenta, já que a temperatura ótima de *L. monocytogenes* varia entre 30ºC e 37ºC (FRANCO; LANDGRAF, 2006). Na polpa, as características psicrotróficas de *L. monocytogenes* ficaram mais evidentes. Os resultados mostraram que a temperatura de 10ºC pode retardar o crescimento de *L. monocytogenes*, porém não é suficiente para inibir seu crescimento. Nas temperaturas de 20ºC e 30ºC o patógeno encontra melhores condições para seu crescimento e em poucas horas pode atingir populações que levariam maior risco à saúde do consumidor. Com relação ao substrato, como foi dito anteriormente, observa-se que tanto a polpa quanto a casca permitem o crescimento de *L. monocytogenes*, porém, o patógeno atinge populações mais elevadas na polpa e tem sua população diminuída mais rapidamente na casca, provavelmente, devido à típica incapacidade dos microrganismos patogênicos em produzir enzimas necessárias à degradação da epiderme vegetal, o que restringe a disponibilidade de nutrientes e água (HARRIS et al., 2003).

4.4 Parâmetros de crescimento

4.4.1 Tempo de geração médio (g)

Baseado nesses experimentos foi possível calcular o tempo de geração médio (g) para *L. monocytogenes* na casca e na polpa das diferentes variedades de caqui, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Tempos de geração (h)[1] para *L. monocytogenes* na casca e na polpa de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' incubadas a diferentes temperaturas

Variedade de caqui	Temperatura de incubação					
	10ºC		20ºC		30ºC	
	Casca	Polpa	Casca	Polpa	Casca	Polpa
'Fuyu'	$10{,}95^{A}$+0,93	$11{,}26^{A}$+0,16	$1{,}75^{A}$+0,16	$1{,}84^{A}$+0,02	$2{,}20^{B}$+0,53	$1{,}40^{B}$+0,18
'Rama Forte'	$15{,}38^{B}$+1,09	$16{,}58^{B}$+0,57	$2{,}07^{B}$+0,06	$2{,}02^{B}$+0,02	$1{,}25^{A}$+0,05	$1{,}11^{A}$+0,03

(1) Resultados expressos com a media de três repetições e desvio padrão para cada parâmetro.
(2) Resultados entre as variedades, seguidos por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade.

A 10ºC os tempos de geração para *L. monocytogenes* diferiram estatisticamente entre as variedades, sendo os tempos de geração (média de 11 horas para a polpa e casca) para a variedade 'Fuyu' cerca de 70% menores que aqueles obtidos para a variedade 'Rama Forte' (média de 16 horas para polpa e casca). Para a casca o tempo de geração na variedade 'Rama Forte' foi cerca de 1,40 vez mais longo do que na variedade 'Fuyu' e, para a polpa, o tempo de geração na variedade 'Rama Forte' foi de aproximadamente 1,47 vez maior do que na outra variedade. A baixa temperatura apesar de ter reduzido, não evitou o crescimento de *L. monocytogenes*. Penteado (2003) obteve valores de tempo de geração a 10ºC de 7,12, 13,03 e 15,05 horas, respectivamente para polpas de melão (pH 5,9), melancia (pH 5,5) e mamão (pH 4,87). No presente estudo obtive-se, a 10ºC, tempos de geração para *L. monocytogenes* na polpa de 11,26 e 16,58h, respectivamente para 'Fuyu' (pH 6,3) e 'Rama Forte' (pH 5,5). Observa-se que o tempo de geração obtido por aquele autor para melancia e mamão foram semelhantes àqueles encontrados no presente estudo.

Sob temperatura de 20ºC, os tempos de geração também diferiram significativamente entre as variedades estudadas. O tempo de geração do caqui 'Rama Forte', nesta temperatura, foi maior do que o 'Fuyu', tanto na casca quanto na polpa. Penteado (2003) obtive valores de tempo de geração de 1,74, 2,17 e 6,42 horas, respectivamente, para polpas de melão, melancia e mamão, a 20ºC. Os dados do presente estudo são bastante semelhantes àqueles obtidos pelo autor citado, principalmente, para as polpas de melão e melancia que apresentaram pHs similares as de variedades de caqui estudadas, ou seja, tempo de geração de 1,84 e 2,02 horas para *L. monocytogenes*, respectivamente, para as variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte'.

Observa-se que de um modo geral, nas temperaturas de 10ºC e 20ºC, tanto na polpa quanto na casca, tempos de geração menores foram obtidos para a variedade 'Fuyu' (pH 6,3), provavelmente devido ao pH mais propício ao desenvolvimento bacteriano dessa variedade. A baixa temperatura apesar de ter reduzido, não evitou o crescimento bacteriano.

Os tempos de geração também diferiram significativamente entre as variedades sob armazenamento a 30ºC. Para a casca o tempo de geração na variedade 'Fuyu' foi cerca de 1,76 vez mais longo do que na variedade 'Rama Forte' e, para a polpa, o

tempo de geração na variedade ‘Fuyu’ foi de aproximadamente 1,26 vez maior do que na outra variedade. Penteado (2003) obteve valores de tempo de geração para *L. monocytogenes* de 0,84, 1,00 e 1,16 horas, respectivamente para as polpas de melão, melancia e mamão, a 30ºC, próximos aos obtidos na presente pesquisa.

4.4.2 Taxa de crescimento exponencial (log UFC/g/h)

Foi calculada também a taxa de crescimento exponencial (log UFC/g/h) para *L. monocytogenes* na casca e na polpa das diferentes variedades de caqui, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Taxas de crescimento exponencial (UFC/g/h)[1] para *L. monocytogenes* na casca e na polpa de caqui ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’ incubadas a diferentes temperaturas

Variedade de caqui	Temperatura de incubação					
	10ºC		20ºC		30ºC	
	Casca	Polpa	Casca	Polpa	Casca	Polpa
‘Fuyu’	$0,03^{A}$±0,01	$0,03^{A}$±0,00	$0,17^{A}$±0,02	$0,16^{A}$±0,00	$0,14^{A}$±0,04	$0,20^{A}$±0,01
‘Rama Forte’	$0,02^{A}$±0,00	$0,02^{A}$±0,00	$0,14^{A}$±0,01	$0,15^{A}$±0,00	$0,24^{B}$±0,01	$0,27^{B}$±0,01

(1) Resultados expressos com a media de três repetições e desvio padrão para cada parâmetro.
(2) Resultados entre as variedades, seguidos por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade.

A 10ºC e a 20ºC, com relação à taxa de crescimento exponencial, tanto para a casca, quanto para a polpa, diferenças significativas não foram observadas entre as variedades.

Na temperatura de 30ºC, houve diferenças significativas entre as variedades estudadas. A taxa de crescimento exponencial da casca de ‘Rama Forte’ foi cerca de 1,71 vez maior do que na variedade ‘Fuyu’ e, na polpa, foi cerca de 1,35 maior no ‘Rama Forte‘ do que no ‘Fuyu’.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que *L. monocytogenes* não pode ser considerada patógeno de relevância em caqui, apesar de ter se observado que não só a polpa, como a casca de caquis ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’, são bons substratos para a sobrevivência e crescimento da bactéria. Temperaturas de refrigeração apenas retardam, porém, não inibem o crescimento do patógeno, fato este que se deve, principalmente, pelas características psicrotróficas de *Listeria*. Temperaturas mais elevadas, de 20ºC e 30ºC, permitem rápida proliferação da bactéria. Os resultados da presente pesquisa indicam que, devido à falta de tecnologia pós-colheita do caqui, ao hábito comum do consumo da fruta com a casca e a sua exposição a temperatura ambiente por várias horas ou dias antes do consumo, existe o risco potencial de contaminação por *L. monocytogenes*. Tendo em vista que o patógeno utiliza o alimento como veículo de transmissão, a baixa dose infectiva da bactéria e a gravidade com que a doença atinge as populações consideradas de risco, boas práticas agrícolas e de higiene durante o cultivo, manuseio pós-colheita e a nível familiar, devem ser rigorosamente obedecidos para não comprometer a segurança alimentar desse fruto. Levantando todos esses pontos em consideração, ainda assim há escassez de publicações envolvendo o estudo de *L. monocytogenes* no Brasil, logo, entende-se que o presente trabalho traz informações valiosas para o âmbito da saúde pública. É justificável a necessidade de maiores estudos, como este, sobre a incidência e comportamento da bactéria.

REFERÊNCIAS

AGUADO, V.; VITAS, A.I.; GARCIA-JALON, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p. 341-347, 2004.

ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, p. 285–293, 1997.

BENATO, E. A.; SIGRIST, J. M. M.; ROCHA, P. Manuseio, aspectos fitossanitários e logística de caqui pós-colheita. **Toda Fruta**, São Paulo, 27 jun. 2005. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/institucional.asp?menu=174>. Acesso em: 18 jun. 2007.

BEUCHAT, L.B., BRACKETT, R.E. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 1367–1371. 1991.

BRACKETT, R.E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 162-164, 1988.

_____. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in products of plant origin. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. ***Listeria*, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999. p.631-655.

BUCKRIESER, C.; RUSNIOK, C.; KUNST, F.; COSSAT, P.; GLASER, P. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution pathogenicity. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 207-213, 2003.

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST – CSPI. **Outbreak alert!:** closing the gaps in our federal food-safety net. Wahington, D.C, 2004. Disponível em: <www.cspinet.org/new/pdf/outbreakalert2004.pdf>. Acesso em: 13 out. 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. FoodNet for Surveillance Report for 2004 (Final Report). **Foodborne diseases active surveillance network**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2004/Report.pdf>. Acesso em: 15 set. 07

_____. CDC. Surveillance for food-borne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Report**, v. 49, p.1-51, 2000.

COLLINS, R.J.; TISDELL, J.S. The influence of storage time and temperature on chilling injury in Fuyu and Suruga persimmon (*Diospyrus kaki* L) grown in subtropical Australia. **Post Harvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 6, n. 1/2, p. 149-157, 1995.

CONWAY, W.S.; LEVERENTZ, B.; SAFTNER, R.A.; JANISIEWICZ, W.J.; SAMS, C.E.; LEBLANC, E. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 177-181, 2000. Disponível em: < http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2000.84.2.177>. Acesso em: 21 set. 2007.

COSSART, P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. **Microbes and Infection**, Berlin, v. 9, p. 1143-1146, 2007.

CUMMINS, A.J.; FIELDING, A.K.; McLAUCHLIN, J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. **The Journal of Infection**, London, v. 28, p. 89– 91, 1994.

DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 705-711, 1996. Disponível em: < http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=167838&blobtype=pdf>. Acesso em: 24 set. 2007.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p. 173-175, 2003.

DONNELLY, C.W. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. ***Listeria*, Listeriosis, and Food Safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999, p. 225-260.

DONNELLY, C.W. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 85, n. 2, p. 495-500, 2002.

DONNELLY, C.W.; BRACKETT, R.E.; DOORES, S.; LEE, W.H.; LOVETT, J. *Listeria* In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 1992, chap. 38, p. 637-663.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTINS, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 8, p. 3819-3822, 2004. Disponível em: < http://jcm.asm.org/cgi/content/full/42/8/3819>. Acesso em: 15 set. 2007.

DOYLE, M.P. Fruit and vegetable safety-Microbiological considerations. **HortScience**, Alexandria, v. 25, n. 12, p.1478-1482, 1990.

DYKES, G.A. Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structure or homogenous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam**,** v. 85, p. 301-306, 2003.

FAO. **Faostat**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 27 set. 2007.

FAO/WHO. Risk Caracterization of *Salmonella* in eggs and broilers and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods**. Disponível em: < http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/may2001.pdf>. Acesso em: 16 out. 2007.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes* a foodborne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FARBER, J.M.; COATES, F.; DALEY, E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, p.103-105, 1992.

FLESSA, S.; LUSK, D.M.; HARRIS, L.J. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 101, n. 3, p. 255-262, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods**. Washington, D.C., 2003 .Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov./~dms/lmr2-2.html#Listeriosis>. Acesso em: 17 set. 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2006. 182p.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 1-15, 2007.

GOUIN, E.; MENGAUD, J.; COSSART, P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, p. 3550-3553, 1994.

GRAY, M.L.; STAFSETH, H.J.; THORP Jr., F.; SHOLL, L.B.; RILEY Jr., W.F. A new technique for isolating *listerellae* from the bovine brain. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 55, p.471-476, 1948.

HARRIS, L.J.; FARBER, J.N.; BEUCHAT, L.R.; PARISH, M.E.; SUSLOW, T.V.; GARRET, E.H.; BUSTA, F.F. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Analysis an evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce**. Chicago, 2003. v. 2. Disponível em: <http://www.ift.org/cms/?pid=1000384>. Acesso em: 27 ago. 2006.

HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8th ed. Imprenta Gaithersburg, AOAC International, 1998. chap. 10, p. 10.01-10.13.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p. 199-202, 2003.

HOFFER, E.; PÓVOA, M. M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em solos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 45-53, 1984.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.K.; SNEATH, P.H.A.; WILLIANS, S.T. *Listeria*. In: HOLT, J.G.; KRIEG, N.K.; SNEATH, P.H.A.; WILLIANS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. p. 566-567.

INGIANNI, A.; FLORIS, M.; PALOMBA, P.; MADEDDU, M.A.; QUARTUCCIO, M.; POMPEI, R. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, by a combination of PCR and DNA probe. **Molecular and Cellular Probes**, Amsterdam, v. 15, p. 275-280, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DA FRUTA - IBRAF. **Informativo**, 2007. Disponível em: <http://www.brazilianfruit.org/>. Acesso em: 15 out. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola municipal**, 2005. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 set. 2006.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. In: **Microbiological specifications of food pathogens**. Imprenta London: Blakie Academic & Professional, 1996. 513 p. (Microrganisms in foods; 5).

JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, p. 199– 204, 2002.

JOHNSON, J.L. USDA-FSIS microbiology laboratory guidebook. Washington: U.S. Department of Agriculture, 1998. v.1 *apud* NORTON, D.M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 85, n. 2, p. 505-515, 2002.

LESSING, M.P.A.; CURTIS, G.D.W.; BOWLER, I.C.J. *Listeria ivanovii* infection. **The Journal of Infection**, London, v. 29, n. 2, p. 230–231, 1994.

MacGOWAN, A.P.; BOWKER, K.; McLAUCHLIN, J.; BENNETT, P.M.; REEVES, D.S. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. Inshop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, p. 325-334, 1994.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. In: BROCK (Ed.) **Biology of microorganisms.** 8th ed. Prentice-Hall: New Jersey, 1997. p. 153.

MARTH, E. H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 165-168, 1988.

MARTINS, F.P.; PEREIRA, F.M. **Cultura do caquizeiro**. Jaboticabal: Funep, 1989. 71 p.

McLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDOW, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p.15– 33, 2004.

McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D.A. **Predictive microbiology: Theory and Application**. Research Studies, 1993. 360p.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, p. 607–625, 1999.

MUÑOZ, V. R. S. **Destanização do caqui (*Diospyrus kaki* L.) "Rama Forte"**. 2002. 164 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). **The Journal of Pathology and Bacteriology**, London, v. 29, p. 407-439, 1926.

OKUTANI, A.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 132, p. 769–772, 2004.

OLSEN, S.; PATRICK, M.; HUNTER, S.; REDDY, V.; KOMSTEIN, L.; MACKENZIE, W.; LANE, K.; BIDOL, S. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 40, p. 962–967, 2005.

PAO, S.; BROWN, E.; SCHNEIDER, K.R. Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, p. 359– 362, 1998.

PARISH, M.E.; BEUCHAT, L.R.; SUSLOW, T.V.; HARRIS, L.J.; GARRET, E.H; FARBER, J.N.; BUSTA, F.F. **Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce** In: Institute of Food Technologists. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Chicago, 2003. v.2. Disponível em: <http://members.ift.org/IFT/Pubs/CRFSFS/archive/supplement.htm>. Acesso em 01 set. 06.

PENTEADO, A.L. **Incidência e desenvolvimento de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em frutas de baixa acidez**. 2003. 117 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PIRIE, J. H. H. *Listeria*: Change of name for a genus of bacteria. Nature. 145:264, 1940, apud RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA, 2001. p. 343-353.

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H.M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, Taiwan, v. 40, p. 4-13, 2007.

ROBERTS, D. *Listeria monocytogenes* in food. **Dairy, Food and Enviromental Sanitation**, Ames, v. 14, n. 4, p.198, 200, 202-204, 1994.

ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. ***Listeria*, listeriosis, and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999, p.1-20.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, p. 197–209, 2000.

ROCOURT, J.; BenEMBAREK, P.; TOYOFUKU, H.; SHLUNDT, J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHOP approach. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p. 263-267, 2003.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA, 2001. p. 343-353.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Listeriosis in animals. In: RYSER, E. T.; MARTH, E.H. ***Listeria*, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 33-44.

SADO, P.N.; JINNEMAN, K.C.; HUSBY, G.J.; SORG, S.M.; OMIECINSKI, C.J. Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurized apple juice using rapid test kits. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, p. 1199– 1202, 1998.

SALAMINA, G.; DONNE, E.D.; NICCOLINI, A.; PODA, G.; CESARONI, D.; BUCCI, M.; FINI, R.; MALDINI, M.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BIBB, W.; ROCOURT, J.; BINKIN, N.; SALMOSO, S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 117, p. 429- 436, 1996.

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

SATO, G.S.; ASSUMPÇÃO, R. Mapeamento e análise da produção do caqui no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 47-54, 2002.

SCHOFIELD, G.M. Emerging food-borne pathogens and their significance in chilled foods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 72, n. 4, p. 267-273, 1992.

SEELINGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383 AL In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1235-1245.

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

SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman and hall, 1993. 454p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA V. C. A.; SILVEIRA N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. ***Listeria*, listeriosis, and food safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 75-96.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001, p. 383-409.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, Berlin, v. 9, p. 1236-1243, 2007.

TIBA, M. A. **Estudo do armazenamento de polpa de caqui (*Diospyros kaki* L.) congelado para elaboração de subprodutos**. 1996. 117 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

TOMPIKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, n. 4, p. 709-725, 2002.

UKUKU, D.O.; FETT, W. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh cut pieces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 924– 930, 2002.

USER´S GUIDE. **Bax® System PCR assay with automated detection for bacterial screening**. Wilmington, DE.: Dupont Qualicon, 2000.

VAHIDY, R.; JAHAN, F.; NASIM, R. Isolation of *Listeria monocytogene*s from fresh fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v. 27, p. 628, 1992.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, M.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, p. 584-640, 2001.

ZHANG, W.; HUGHES, A.; WILT, G.; KNABEL, S.J. The Bax® PCR assay for screening *Listeria monocytogenes* targets a partial putative gene *Imo*2234. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, n. 7, p. 1507-1511, 2004.

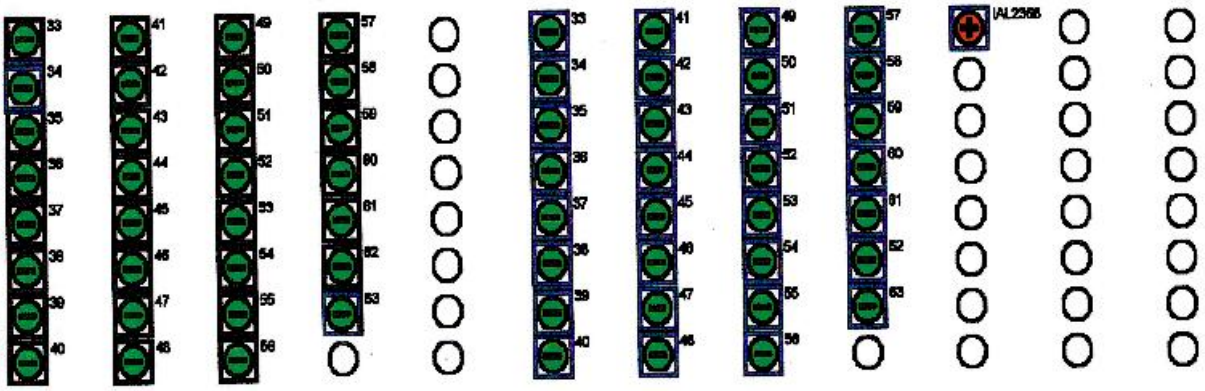
ZHENG, W.; KATHARIOU, S. Differentiation of epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes* by restriction fragment length polymorphism in a gene region essential for growth at low temperatures (4ºC). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4310-4314, 1995.

ANEXOS

ANEXO A – Resultados dos “rack report” do sistema Bax® para a detecção de *Listeria monocytogenes*

File: 25.05.06.bax.

Rack Name:	
Accession:	53
Rack Status:	Rack processing completed normally.
Rack Description:	
Operator:	
FIU Data File:	25.05.06.fiu
Time of Verification:	05/24/2006 09:52:17
Time of PCR Run:	05/25/2006 14:27:39
Time of Detection:	05/25/2006 15:30:53
Time of Analysis:	05/25/2006 15:30:55, SW ver: 1.85 b660, Targ ver: 1.85



Negativo para as amostras

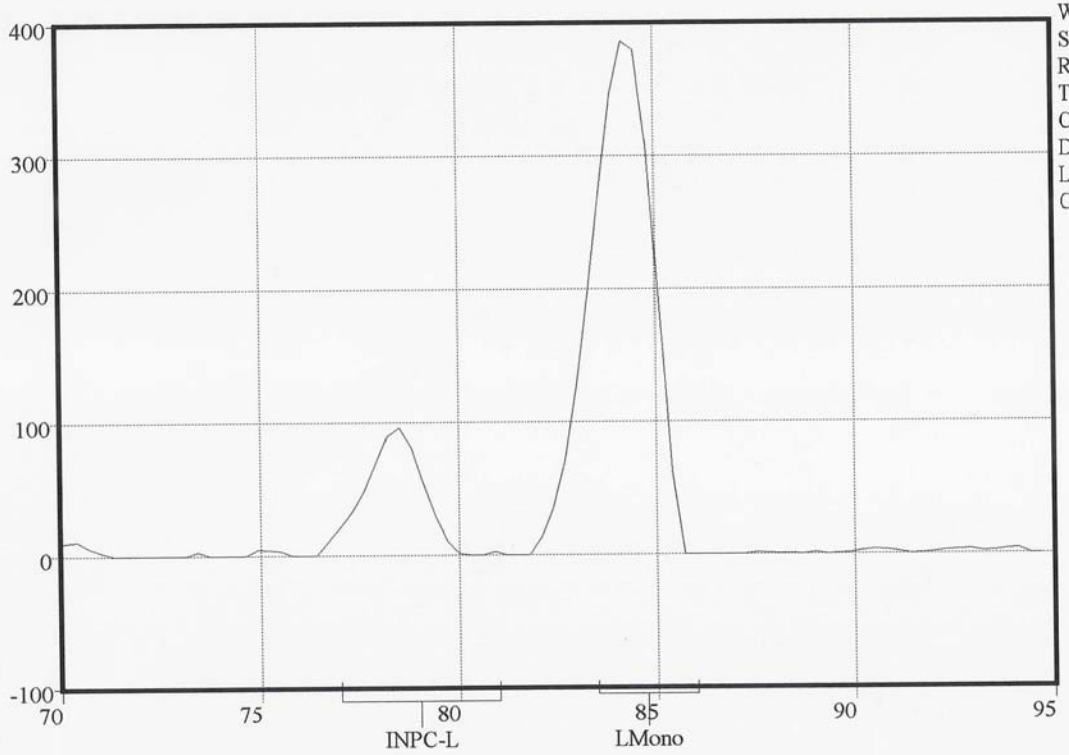
Positivo para a cultura bacteriana IAL 2368

Vazio

ANEXO B - Perfil da curva de fusão (melting curve) da cultura bacteriana de *Listeria monocytogenes*, IAL 2368, pelo sistema Bax®

File: 25.05.06.bax.

Rack Name:	
Accession:	53
Rack Status:	Rack processing completed normally.
Rack Description:	
Operator:	
FIU Data File:	25.05.06.fiu
Time of Verification:	05/24/2006 09:52:17
Time of PCR Run:	05/25/2006 14:27:39
Time of Detection:	05/25/2006 15:30:53
Time of Analysis:	05/25/2006 15:30:55, SW ver: 1.85 b660, Targ ver: 1.85



Well:	73
Sample ID:	IAL2368
Result:	Positive
Target:	Listeria monocytogenes
Control:	Internal
Description:	Projeto Caqui
Lot Number:	Q5215
Control Status:	Positive