

I.S.C.N.A.U.P.
Curso de Ciências da Nutrição da Universidade do Porto

Avaliação da Qualidade
Microbiológica de
Canela, Pimenta Preta e Pimenta
Branca

Patrícia Sofia Carneiro Antunes
Porto 1997



ÍNDICE

1) INTRODUÇÃO	2
2) OBJECTIVOS	5
3) MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1) Amostragem	6
3.2) Análise Microbiológica	7
3.2.1) Planificação e normas do trabalho laboratorial	7
3.2.2) Colheita e preparação da amostra	8
3.2.3) Determinações microbiológicas	10
3.2.3.1) Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos	10
3.2.3.2) Contagem de bolores e leveduras	11
3.2.3.3) Pesquisa de coliformes	11
3.2.3.4) Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	12
3.2.3.5) Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.2.3.6) Pesquisa de <i>Salmonella</i>	13
3.2.3.7) Pesquisa de clostrídios sulfito-redutores	14
3.2.3.8) Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	15
4) RESULTADOS	16
4.1) Resultados por Especiaria	16
4.1.1) Canela	16
4.1.2) Pimenta preta	19
4.1.3) Pimenta branca	21
4.2) Resultados por Parâmetro Microbiológico	23
5) DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	28
5.1) Contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos	28
5.2) Contagem de Bolores e Leveduras	31
5.3) Pesquisa de Coliformes	35
5.4) Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	36
5.5) Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
5.6) Pesquisa de <i>Salmonella</i>	38
5.7) Pesquisa de Clostrídios Sulfito-Redutores	40
5.8) Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	41
6) CONCLUSÕES	45
BIBLIOGRAFIA	

“ Tenho grande desejo de saber das drogas medicinais (as que chamão lá em Portugal de botica) e destoutras mézinhas simples, que qua ha, ou fruitas todas, e da pimenta, das quais cousas queria saber os nomes em todas as línguas, assi das terras donde nascem e das arvores ou prantas que as crião, e assi queria saber como usão dellas os fisicos indianos, e tambem queria saber dalgumas outras plantas e fruitos desta terra, ainda que não sejam medicinais, e assi dalguns costumes desta terra, ou cousas que nella acontecerão, porque todas estas cousas ham de ser ditas na verdade”

Garcia de Orta
Colóquios dos Simples e Drogas e Cousas Medicinais da Índia, séc.XVI

1) INTRODUÇÃO

O uso das ervas aromáticas e especiarias para realçar as propriedades organolépticas dos alimentos remonta à Pré-História (Madrid, 1986).

Ao longo da História da civilização, as especiarias e as ervas aromáticas constituíram um dos sectores mais importantes da economia mundial (Castro, 1985), pertencendo aos países mais ricos e poderosos o controlo comercial desses produtos (Macrae et al, 1993).

Embora o Homem das Civilizações Egípcia, Grega, Árabe, Romana e Chinesa tenha procurado monopolizar o comércio das especiarias (Tannahill, 1988), só durante a época dos Descobrimentos é que o uso desses produtos se generalizou na Europa, tendo a participação portuguesa contribuído significativamente para o crescente comércio mundial das especiarias (Castro, 1985).

Através do estabelecimento de relações comerciais com o Oriente, os portugueses introduziram na Europa especiarias, como a pimenta, o gengibre, a canela, o cravo e a noz moscada, em troca de outras mercadorias que levavam da Europa (prata amoeda, mercúrio, cobre, vinho, azeite, tecidos, vidros e ferramentas, por exemplo). De todas as especiarias comercializadas com o Oriente, a pimenta tornou-se sem dúvida a mais importante, servindo até de moeda (Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira). No entanto, ainda antes do afluxo das especiarias da Índia, os portugueses foram também responsáveis pela comercialização das especiarias africanas - malagueta e pimenta-de-rabo - na Europa do século XV (Castro, 1985).

As especiarias eram utilizadas não só como condimentos para aromatizar os alimentos, mas também como ingredientes de perfumes, cores para tinturaria e para fins medicinais (Godinho, 1965; Tannahill, 1988). Eram também usadas para

mascarar o cheiro e o sabor dos alimentos, como carne e peixe, conservados pela acção da salga ou fumagem, sobretudo durante os meses de Inverno em que não havia alimentos frescos disponíveis (Godinho, 1965; Tannahill, 1988). Contudo, durante muito tempo, estes produtos eram apenas acessíveis às classes mais ricas, pois como afluíam em quantidades escassas, o seu preço era muito elevado (Godinho, 1965).

Actualmente, generalizou-se a procura de ingredientes como as ervas aromáticas e as especiarias, não pelo seu valor alimentar directo, mas por constituírem um grupo importante de aromatizantes úteis no processamento culinário e industrial (Rogers, 1990; Oliveira et al, 1994). Graças às características de cor, sabor e aroma que transmitem às preparações culinárias, tornam-se importantes para o estabelecimento das nossas relações sensoriais com os alimentos, para além de proporcionarem prazer durante a ingestão de alimentos e bebidas (Rogers, 1990; Macrae et al, 1993; Oliveira et al, 1994). Também na indústria alimentar, perante o crescente aparecimento de produtos, tornou-se indispensável a utilização de especiarias e ervas aromáticas para manter a ligação com sabores, aromas e cores tradicionais de alimentos a que estamos habituados (Oliveira et al, 1994).

Numa sociedade debelada por graves doenças metabólicas e degenerativas e que começa agora a tentar recuperar o seu património culinário tradicional saudável, as ervas aromáticas e as especiarias desempenham papel fundamental ao permitirem dispensar ou minimizar a utilização de sal e gordura na confecção dos alimentos (Rogers, 1990; Peres, 1992).

Apesar das especiarias serem consideradas produtos não perecíveis, sob condições normais de armazenamento (Guarino et al, 1992), e de algumas até possuírem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, o que lhes permite ajudar na conservação de alimentos (Guarino et al, 1992; Macrae et al, 1993), alguns

destes produtos podem constituir uma importante fonte de contaminação microbiana (McKee, 1995). De facto, as especiarias são produzidas em zonas tropicais ou subtropicais com características sanitárias deficientes, onde as condições de manuseamento, secagem e armazenamento extremamente precárias, aliadas a climas quentes e húmidos, as tornam susceptíveis a contaminação microbiana potencial (Macrae et al, 1993; McKee, 1995). As fontes de contaminação podem ser humanas ou animais (insectos, aves e roedores), podendo encontrar-se entre as especiarias materiais estranhos como pedras, metais, vidro, areia, penas, insectos e seus fragmentos, cabelos e excrementos (Macrae et al, 1993). Aliás, sabe-se que a pimenta, sendo um produto escasso e caro, foi sempre adulterada com materiais semelhantes como casca de mostarda, farinha de ervilha e grãos de zimbro, e mesmo com detritos existentes no chão da sala de armazenamento - "pepper dust" (Tannahill, 1988).

Segundo a NP 1047 de 1974, considera-se especiaria o "produto vegetal ou mistura de produtos vegetais, isentos de substâncias estranhas, utilizado para dar sabor e aroma específicos aos alimentos"; o produto pode apresentar-se inteiro, fraccionado ou moído. Considerando que as especiarias são utilizadas para temperar alimentos crus e cozinhados, e constituem ingredientes essenciais de determinados alimentos processados industrialmente, é fundamental assegurar a sua qualidade microbiológica tendo em vista prevenir a deterioração dos alimentos, com perda das suas qualidades, e evitar riscos para a saúde dos consumidores.

2) OBJECTIVOS

O objectivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de algumas marcas comerciais de canela, pimenta preta e pimenta branca moídas, disponíveis no mercado português para venda aos consumidores.

Avaliaram-se os seguintes parâmetros microbiológicos:

- microrganismos aeróbios mesófilos;
- bolores e leveduras;
- coliformes;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Salmonella*;
- clostrídios sulfito-redutores;
- *Clostridium perfringens*.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Amostragem

Para proceder a uma avaliação da qualidade microbiológica de especiarias comercializadas no mercado nacional foram adquiridas embalagens de canela moída, pimenta preta moída e pimenta branca moída. Fez-se esta escolha, pois de acordo com a literatura consultada sobre este tema (McKee, 1995) estas especiarias encontram-se frequentemente contaminadas. Além disso, estes produtos são muito utilizados na culinária portuguesa para temperar alimentos, quer crus, quer cozinhados.

Em termos de amostragem, adoptou-se a seguinte metodologia:

- todas as especiarias foram adquiridas num hipermercado do Grande Porto;
- foram adquiridas todas as marcas (três) comercializadas nesse hipermercado;
- foram avaliadas 3 amostras do mesmo lote para cada marca adquirida e de cada especiaria;
- cada amostra era maior ou igual a 100g, sendo constituída por uma ou várias embalagens.

As embalagens adquiridas apresentavam-se em bom estado de conservação e dentro do prazo de validade. Uma das três marcas comerciais mencionava no rótulo que o produto tinha sido submetido a rigoroso controlo de qualidade em laboratório.

3.2) Análise Microbiológica

3.2.1) Planificação e normas do trabalho laboratorial

A partir do estudo exaustivo das Normas Portuguesas de Microbiologia Alimentar seleccionadas para a execução deste trabalho, avaliaram-se os meios materiais (utensílios, diluentes, meios de cultura, reagentes e suplementos) necessários para a realização das determinações microbiológicas.

Posteriormente, foi preparada uma das salas do Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UP (SLMFMUP) para a realização deste trabalho. Uma das peças fundamentais em termos de equipamento foram as estufas. Nesse sentido, procedeu-se à sua regulação para obter temperaturas constantes adequadas a cada uma das técnicas. Durante este período, a temperatura foi verificada diariamente através de termómetro com reservatório imerso em glicerol, colocado dentro de cada estufa. A temperatura dos banhos de água foi também controlada diariamente por meio de termómetro independente do sistema de regulação automática.

A preparação dos utensílios, diluentes e meios de cultura e todas as técnicas aplicadas nas determinações microbiológicas foram efectuadas de acordo com a NP 2079 (1989).

Os meios de cultura e diluentes foram preparados em recipientes de vidro dissolvendo, em água destilada, os componentes desidratados pesados de acordo com as indicações da norma respectiva e/ou do fabricante.

No dia da realização das sementeiras procedeu-se também à preparação dos meios de cultura a utilizar, tratando-se de preparações extemporâneas.

Em cada uma das determinações microbiológicas efectuadas procedeu-se à incubação de um tubo ou placa de Petri testemunho contendo o meio de cultura a utilizar para comprovar a sua esterilidade.

À medida que foi sendo adquirido o material necessário para a execução das diferentes determinações microbiológicas realizaram-se ensaios piloto.

Durante a execução da quase totalidade das determinações microbiológicas fizeram-se sementeiras dos microrganismos a pesquisar, nos meios de cultura preparados, com o objectivo de poder observar facilmente o seu comportamento perante as condições fornecidas, o que facilitava a interpretação dos resultados obtidos com as amostras analisadas (controlo positivo).

Aleatoriamente, procedeu-se à inoculação dos microrganismos a pesquisar numa determinada quantidade da suspensão-mãe de várias amostras; esta era depois semeada nas mesmas condições da amostra, permitindo assim testar as técnicas microbiológicas em especiarias.

3.2.2) Colheita e preparação da amostra

A colheita e preparação das amostras para análise microbiológica foi feita em câmara de fluxo laminar e de acordo com as NP 1828 (1982), NP 1829 (1982), NP 3005 (1985) e NP 2079 (1989).

Estabeleceram-se os seguintes procedimentos na câmara de fluxo laminar:

- a parte exterior das embalagens era previamente limpa com álcool a 70° (V/V);
- para abrir as embalagens utilizaram-se tesouras esterilizadas;

- a amostra era constituída pelo conteúdo total das embalagens despejadas para um goblé onde se procedia à homogeneização da amostra mexendo com uma espátula esterilizada;

- pesava-se num matraz contendo pérolas de vidro, devidamente esterilizados, uma quantidade de amostra de massa maior ou igual a 10 g, isto é, suficiente para que pudessem ser executadas todas as análises e todas as diluições previstas;

- juntava-se um volume de diluente (solução de triptona-sal) correspondente a 9 vezes a massa pesada do produto, de modo a obter-se a suspensão-mãe (diluição 10^{-1});

- procedia-se à agitação manual da suspensão-mãe, deixando depositar as partículas grosseiras do produto;

- de modo a ser possível repetir alguma das determinações, caso fosse necessário, colocava-se uma porção de cada amostra em duas placas de Petri esterilizadas que posteriormente eram vedadas com parafilme, colocadas em sacos de plástico e conservadas a -18° C.

No laboratório estabeleceram-se os seguintes procedimentos:

- com uma pipeta media-se 1 ml da suspensão-mãe para um tubo de ensaio contendo 9 ml de diluente esterilizado, misturando-se por agitação mecânica de modo a obter a diluição 10^{-2} ;

- repetiam-se estas operações a partir da diluição 10^{-2} para se obter a diluição 10^{-3} e assim sucessivamente até se conseguir obter a diluição decimal apropriada.

3.2.3) Determinações microbiológicas

No SLMFMUP procedeu-se à execução das seguintes determinações microbiológicas, de acordo com as análises efectuadas por rotina em laboratórios oficiais de microbiologia alimentar:

3.2.3.1) Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos

Com base na NP 1995 (1982) fez-se:

- sementeira por incorporação em placa, de várias diluições decimais dependendo do grau de contaminação previsto, no meio de cultura *Plate Count Agar*,

- incubação durante 72 ± 3 h a $30 \pm 1^\circ$ C;

- cálculo do número de microrganismos por grama de produto, a partir do número de colónias desenvolvidas.

No entanto, de acordo com métodos seguidos por outros laboratórios, fizeram-se algumas adaptações a esta norma: adição do corante 2,3,5 trifeniltetrazólio ao meio de cultura no sentido de auxiliar a contagem das colónias (Guarino et al, 1992); as sementeiras não foram feitas em duplicado por razões de ordem prática, nomeadamente gastos excessivos de material e produtos de laboratório, indisponibilidade de espaço e de tempo; o cálculo e apresentação dos resultados foi feito de acordo com a NP 2079 (1989) - contagem de colónias na(s) placa(s) que contenha(m) entre 15 e 150 colónias.

3.2.3.2) Contagem de bolores e leveduras

Com base na NP 3277-1 (1987) fez-se:

- sementeira à superfície do meio de cultura de *Cooke Rose Bengal*, adicionado de solução aquosa de oxitetraciclina, de uma diluição decimal atendendo ao grau de contaminação previsto;

- incubação a $25\pm 1^\circ$ C durante 120 ± 2 h;

- cálculo do número de bolores e de leveduras por grama de produto, a partir do número de colónias desenvolvidas.

No entanto, de acordo com métodos seguidos por outros laboratórios, fizeram-se também algumas adaptações a esta norma: utilizou-se, como antibacteriano, uma solução aquosa de tetraciclina numa forma oxidada em vez de clorada; na sementeira utilizou-se apenas uma diluição, de acordo com o grau de contaminação previsto.

3.2.3.3) Pesquisa de coliformes

Segundo a NP 2164 (1983) fez-se:

- sementeira de um determinado volume da suspensão-mãe e de respectivas diluições decimais em tubos de ensaio, contendo tubos de Durham, com meio de cultura selectivo caldo verde brilhante;

- incubação a $30\pm 1^\circ$ C durante 48 h;

- verificação da formação de gás por fermentação da lactose do meio de cultura.

3.2.3.4) Pesquisa de *Escherichia coli*

Segundo a NP 2308 (1986) fez-se:

- repicagem, a partir de cada um dos tubos de caldo verde brilhante que apresentaram resultado positivo na pesquisa de bactérias coliformes, de uma ansa com cultura para novo tubo de ensaio com caldo verde brilhante e outra para tubo de ensaio com água peptonada;

- incubação em banho de água a $44,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$ durante 48 h;

- verificação da produção de gás no meio de cultura caldo verde brilhante e de produção de indol na água peptonada.

3.2.3.5) Contagem de *Staphylococcus aureus*

Com base na NP 4196 (1992) fez-se:

- sementeira à superfície do meio de cultura de *Baird-Parker*, de um determinado volume da suspensão-mãe e de respectivas diluições decimais;

- incubação a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 a 48 h;

- cálculo do número de *S.aureus* por grama de produto.

No entanto, de acordo com métodos seguidos por outros laboratórios, planejaram-se algumas adaptações a esta norma: não fazer as sementeiras em duplicado por razões de ordem prática, nomeadamente gastos excessivos de material e produtos de laboratório, indisponibilidade de espaço e de tempo; utilizar uma ansa em vez do semeador de vidro para proceder à sementeira no meio de cultura, pois facilitava a execução da técnica; fazer a confirmação das colónias características isoladas utilizando-se um sistema de identificação comercial em vez da prova tradicional de pesquisa de coagulase.

3.2.3.6) Pesquisa de *Salmonella*

Com base na NP 870 (1988), NP utilizada para esta determinação pelos organismos de controlo oficiais em vez da NP 1933 (1982), fez-se:

- Pré-enriquecimento: na câmara de fluxo laminar pesavam-se 25 g da amostra para o meio de cultura água peptonada tamponada (225 ml) obtendo-se uma diluição de 1/10 (suspensão-mãe); incubação a 37° C durante 16 a 24 h;

- Enriquecimento: sementeira da cultura de pré-enriquecimento nos meios de enriquecimento - 0,1 ml para tubo de ensaio contendo 10 ml de caldo *Rappaport-Vassiliades* e de 1 ml para tubo de ensaio contendo 9 ml de caldo de selenito-cistina; incubação durante 24 h a, respectivamente, 43 e 37° C;

- Isolamento: sementeira das culturas de enriquecimento em três meios de isolamento selectivos - meio de verde brilhante e vermelho de fenol, meio agar SS e meio agar sulfito de bismuto; incubação a 37° C durante 24 h;

- Confirmação: repicagem de colónias suspeitas de serem *Salmonella* para meio de cultura de Kligler; incubação a 37° C durante 24 h; caso surgissem resultados positivos para *Salmonella* fazia-se sementeira dessas culturas para meio de ureia de Christensen; incubação a 37° C durante 24 a 48 h; aglutinação das culturas positivas para *Salmonella* com um soro polivalente anti-*Salmonella*; confirmação bioquímica restante em sistema miniaturizado comercial (API 20-E).

No entanto, de acordo com métodos seguidos por outros laboratórios, planearam-se algumas adaptações a esta norma: efectuar o enriquecimento de acordo com o procedimento já descrito acima, em vez de inocular 10 ml de cultura de pré-enriquecimento em frasco contendo 100 ml de meio de selenito-cistina; o período total de incubação dos meios de enriquecimento ser de 24 h e não de 24 h seguidas de mais 24 h; o isolamento ser feito em meio de cultura de verde brilhante e vermelho de fenol (NP) e em mais dois meios selectivos à escolha (a utilização de

mais um meio de cultura selectivo do que o descrito na NP referida permitia aumentar a possibilidade de isolar *Salmonella*); só se proceder à realização de outras provas bioquímicas se as reacções no meio de cultura de Kligler e de Ureia fossem concordantes com a hipótese de ser *Salmonella*; para a realização das provas bioquímicas utilizar-se um sistema miniaturizado comercial (API 20-E), previsto na ISO 6579 (1993), em vez das provas tradicionais referidas na NP 870 (1988); as provas serológicas de confirmação de *Salmonella* não se realizarem no laboratório devido ao seu elevado custo e especificidade técnica, procedendo-se ao envio das estirpes isoladas para o "Centro de Salmonella" (INSA) para determinação definitiva do serótipo.

3.2.3.7) Pesquisa de clostrídios sulfito-redutores

Com base na NP 2262 (1986) fez-se:

- sementeira em VL duplo por incorporação em tubo de ensaio, de um determinado volume da suspensão-mãe e de respectivas diluições decimais, previamente aquecidas a $80 \pm 0,5^\circ$ C durante 10 minutos para inactivação das formas vegetativas microbianas;
- incubação a $37 \pm 1^\circ$ C durante 1 a 5 dias;
- verificação da existência de colónias características de clostrídios sulfito-redutores.

No entanto, de acordo com métodos seguidos por outros laboratórios, fizeram-se algumas adaptações a esta norma: as sementeiras não foram feitas em duplicado por razões de ordem prática, nomeadamente gastos excessivos de material e produtos de laboratório, indisponibilidade de espaço e de tempo; utilizou-se o meio de cultura proposto, mas de concentração dupla, pois é mais eficaz nesta pesquisa; não se semeou a diluição 10^0 (10 ml da suspensão-mãe).

3.2.3.8) Contagem de *Clostridium perfringens*

Com base na NP 2261 (1986) fez-se:

- sementeira por incorporação em placa, de um determinado volume da suspensão-mãe e de respectivas diluições decimais, no meio de cultura de agar triptose-sulfito com cicloserina (agar SC) isento de gema de ovo;

- incubação a 37° C em anaerobiose durante 20 h;

- contagem do número de colónias características;

- confirmação bioquímica de colónias características em meio nitrato mobilidade e em meio lactosado com gelatina; incubação a 37° C em anaerobiose durante 24 h;

- cálculo do número de *C.perfringens* por grama de produto a partir do número de colónias características confirmadas pelas provas anteriores.

No entanto, de acordo com métodos seguidos por outros laboratórios, fizeram-se algumas adaptações a esta norma: as sementeiras não foram feitas em duplicado por razões de ordem prática, nomeadamente gastos excessivos de material e produtos de laboratório, indisponibilidade de espaço e de tempo; para confirmação bioquímica eram seleccionadas no máximo 3 colónias características, não sendo possível por falta de espaço na jarra de anaerobiose, gastos excessivos de material e indisponibilidade de tempo, seleccionar as 10 colónias indicadas na NP.

4) RESULTADOS

4.1) Resultados por Especiaria

4.1.1) Canela

No quadro 1 apresentam-se os resultados das determinações microbiológicas para as nove amostras de canela moída. Foram analisadas três amostras de cada uma das três marcas comercializadas (A, B e C).

Salientam-se os seguintes resultados:

As contagens totais de microrganismos aeróbios mesófilos apresentam valores da ordem de 10^5 CFU/g, variando de 2.5×10^5 a 5.8×10^5 CFU/g, sendo a média (\pm dp) de 4.0×10^5 ($\pm 1.1 \times 10^5$) CFU/g, e a mediana de 4.1×10^5 CFU/g.

As contagens de fungos (bolores e leveduras) apresentam valores da ordem de 10^4 CFU/g, variando de 1.3×10^4 a 6.7×10^4 CFU/g, sendo a média (\pm dp) de 3.4×10^4 ($\pm 2.1 \times 10^4$) CFU/g, e a mediana de 2.5×10^4 CFU/g. Os bolores foram os grandes responsáveis pelo teor fúngico apresentado pela canela, isolando-se leveduras em apenas 2 amostras (22%). Nas restantes 7 amostras não se isolaram leveduras na mais baixa diluição examinada, de modo que os resultados das contagens se expressam como $<10^3$ CFU/g.

dp = desvio padrão

QUADRO 1

CANELA MOÍDA

Amostra	Origem ¹ (Ref ²)	Aeróbios / g	Bolores / g	Leveduras / g	Fungos ² / g	Coliformes	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> / g	<i>Salmonella</i>	clostrídios sulfito-redutores	<i>C. perfringens</i> / g
1	A	5,8 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁴	< 10 ³	3,3 x 10 ⁴	Pos 10 ⁻² g Neg 10 ⁻³ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	1,0 x 10 ²
2	A	2,5 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁴	< 10 ³	2,5 x 10 ⁴	Pos 10 ⁻² g Neg 10 ⁻³ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10 ²
3	A	2,6 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ³	2,1 x 10 ⁴	Pos 10 ⁻² g Neg 10 ⁻³ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	1,0 x 10 ²
4	B	4,1 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	< 10 ³	1,5 x 10 ⁴	Pos 10 ⁰ g Neg 10 ⁻¹ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Pos 10 ⁻² g Neg 10 ⁻³ g	5,0 x 10
5	B	3,4 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁴	< 10 ³	1,3 x 10 ⁴	Neg 10 ⁰ g	---	< 10 ²	Neg 25 g	Pos 10 ⁻¹ g Neg 10 ⁻² g	< 10
6	B	5,1 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	< 10 ³	1,7 x 10 ⁴	Neg 10 ⁰ g	---	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
7	C	4,4 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁴	1,0 x 10 ³	5,7 x 10 ⁴	Neg 10 ⁰ g	---	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10 ²
8	C	3,9 x 10 ⁵	5,5 x 10 ⁴	< 10 ³	5,5 x 10 ⁴	Neg 10 ⁰ g	---	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	2,0 x 10 ²
9	C	4,3 x 10 ⁵	6,7 x 10 ⁴	< 10 ³	6,7 x 10 ⁴	Neg 10 ⁰ g	---	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10 ²

¹ A, B e C representam as três marcas comerciais analisadas; ² fungos = bolores + leveduras; Abreviaturas: Pos = positivo e Neg = negativo.

A pesquisa de microrganismos coliformes foi positiva em 4 amostras (44%) pertencentes a 2 marcas (A e B), apresentando resultados que variam entre pesquisa positiva em 10^0 g e negativa em 10^{-3} g ($1-10^3$ /g). A maioria das amostras (5) apresentou a pesquisa de coliformes negativa em 10^0 g (<1 /g).

Nas 4 amostras em que se procedeu à pesquisa de *Escherichia coli*, esta foi negativa em 10^0 g (<1 /g).

Nenhuma das amostras continha *Staphylococcus aureus* na mais baixa diluição analisada, de modo que os resultados das contagens se expressam como $<10^2$ CFU/g.

Todas as amostras analisadas apresentaram pesquisa negativa de *Salmonella* em 25 g.

A pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi positiva em 2 amostras (22%) da marca B, apresentando resultados que variam entre pesquisa positiva em 10^{-1} g e negativa em 10^{-3} g ($10-10^3$ /g). Em todas as outras amostras (7) verificou-se que a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi negativa em 10^{-1} g (<10 /g).

As contagens de *Clostridium perfringens* variam de <10 a 2.0×10^2 CFU/g, tendo sido isolado este microrganismo em 4 amostras (44%). Nas restantes 5 amostras não se isolou *C.perfringens* na mais baixa diluição examinada, de modo que os resultados das contagens se expressam como <10 CFU/g ou $<10^2$ CFU/g, conforme o caso.

4.1.2) Pimenta preta

No quadro 2 apresentam-se os resultados das determinações microbiológicas para as nove amostras de pimenta preta moída. Foram analisadas três amostras de cada uma das três marcas comercializadas (A, B e C).

Salientam-se os seguintes resultados:

As contagens totais de microrganismos aeróbios mesófilos apresentam valores da ordem de 10^7 CFU/g, variando de 1.0×10^7 a 2.5×10^7 CFU/g, sendo a média (\pm dp) de 1.5×10^7 ($\pm 0.5 \times 10^7$) CFU/g, e a mediana de 1.4×10^7 CFU/g.

As contagens de fungos (bolores e leveduras) apresentam valores da ordem de 10^2 - 10^3 CFU/g, de acordo com a marca comercial, variando de 2.0×10^2 a 5.0×10^3 CFU/g, sendo a média (\pm dp) de 1.7×10^3 ($\pm 1.7 \times 10^3$) CFU/g, e a mediana de 9.0×10^2 CFU/g. Não foram isoladas leveduras em nenhuma das amostras na mais baixa diluição examinada, de modo que os resultados das contagens se expressam como $<10^2$ CFU/g ou $<10^3$ CFU/g, conforme o caso.

A pesquisa de microrganismos coliformes foi positiva em 5 amostras (56%) pertencentes a 2 marcas (A e C), apresentando resultados que variam entre pesquisa positiva em 10^0 g e negativa em 10^{-2} g ($1-10^2$ g). Nas restantes 4 amostras a pesquisa foi negativa em 10^0 g ($<1/g$).

Nas 5 amostras em que se procedeu à pesquisa de *Escherichia coli*, esta foi negativa em 10^0 g ($<1/g$).

Nenhuma das amostras continha *Staphylococcus aureus* na mais baixa diluição analisada, de modo que os resultados das contagens se expressam como $<10^2$ CFU/g.

Todas as amostras analisadas apresentaram pesquisa negativa de *Salmonella* em 25 g.

QUADRO 2

PIMENTA PRETA MOÍDA

Amostra	Origem ¹ (Ref ²)	Aeróbios / g	Bolores / g	Leveduras / g	Fungos ² / g	Coliformes	E. coli	S. aureus / g	Salmonella	clostrídios sulfito -redutores	C. perfringens / g
10	A	2,5 x 10 ⁷	2,0 x 10 ³	< 10 ³	2,0 x 10 ³	Neg 10 ⁰ g	—	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
11	A	1,3 x 10 ⁷	5,0 x 10 ³	< 10 ³	5,0 x 10 ³	Pos 10 ⁰ g Neg 10 ⁻¹ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
12	A	2,0 x 10 ⁷	4,0 x 10 ³	< 10 ³	4,0 x 10 ³	Pos 10 ⁰ g Neg 10 ⁻¹ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
13	B	1,4 x 10 ⁷	1,1 x 10 ³	< 10 ²	1,1 x 10 ³	Neg 10 ⁰ g	—	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
14	B	1,0 x 10 ⁷	7,0 x 10 ²	< 10 ²	7,0 x 10 ²	Neg 10 ⁰ g	—	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
15	B	1,1 x 10 ⁷	2,0 x 10 ²	< 10 ²	2,0 x 10 ²	Neg 10 ⁰ g	—	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
16	C	1,4 x 10 ⁷	7,0 x 10 ²	< 10 ²	7,0 x 10 ²	Pos 10 ⁻¹ g Neg 10 ⁻² g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
17	C	1,3 x 10 ⁷	9,0 x 10 ²	< 10 ²	9,0 x 10 ²	Pos 10 ⁻¹ g Neg 10 ⁻² g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	1,0 x 10
18	C	1,9 x 10 ⁷	7,0 x 10 ²	< 10 ²	7,0 x 10 ²	Pos 10 ⁰ g Neg 10 ⁻¹ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10

¹ A, B e C representam as três marcas comerciais analisadas; ² fungos = bolores + leveduras; Abreviaturas: Pos = positivo e Neg = negativo.

Em todas as amostras analisadas a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi negativa em 10^{-1} g ($<10/g$).

As contagens de *Clostridium perfringens* variam de <10 a 1×10 CFU/g, tendo sido isolado este microrganismo em apenas uma amostra (11%) da marca C. Nas restantes 8 amostras não se isolou *C.perfringens* na mais baixa diluição examinada, de modo que os resultados das contagens se expressam como <10 CFU/g.

4.1.3) Pimenta branca

No quadro 3 apresentam-se os resultados das determinações microbiológicas para as nove amostras de pimenta branca moída. Foram analisadas três amostras de cada uma das três marcas comercializadas (A, B e C).

Salientam-se os seguintes resultados:

As contagens totais de microrganismos aeróbios mesófilos apresentam valores da ordem de 10^4 - 10^5 CFU/g, de acordo com a marca comercial, variando de 2.3×10^4 a 2.3×10^5 CFU/g, sendo a média (\pm dp) de 1.2×10^5 ($\pm 0.8 \times 10^5$) CFU/g, e a mediana de 1.2×10^5 CFU/g.

As contagens de fungos (bolors e leveduras) apresentam valores da ordem de 10^3 - 10^4 CFU/g, de acordo com a marca comercial, variando de 3.6×10^3 a 3.6×10^4 CFU/g, sendo a média (\pm dp) de 1.6×10^4 ($\pm 1.2 \times 10^4$) CFU/g, e a mediana de 1.2×10^4 CFU/g. Os bolors foram os grandes responsáveis pelo teor fúngico apresentado pela pimenta branca, isolando-se leveduras em apenas 2 amostras (22%). Nas restantes 7 amostras não se isolaram leveduras na mais baixa diluição examinada, de modo que os resultados das contagens se expressam como $<10^2$ CFU/g.

QUADRO 3

PIMENTA BRANCA MOÍDA

Amostra	Origem ¹ (Ref)	Aeróbios / g	Bolores / g	Leveduras / g	Fungos ² / g	Coliformes	E.coli	S.aureus / g	Salmonella	clostrídios sulfito - -reduzores	C.perfringens / g
19	A	2,0 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	3,1 x 10 ⁴	Pos 10 ¹ g Neg 10 ⁻² g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
20	A	2,3 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁴	< 10 ²	3,6 x 10 ⁴	Pos 10 ⁻² g Neg 10 ⁻³ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
21	A	1,2 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁴	< 10 ²	2,5 x 10 ⁴	Pos 10 ⁻¹ g Neg 10 ⁻² g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
22	B	2,3 x 10 ⁴	3,6 x 10 ³	< 10 ²	3,6 x 10 ³	Pos 10 ⁰ g Neg 10 ⁻¹ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
23	B	3,9 x 10 ⁴	5,2 x 10 ³	< 10 ²	5,2 x 10 ³	Pos 10 ⁻¹ g Neg 10 ⁻² g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
24	B	3,4 x 10 ⁴	4,8 x 10 ³	< 10 ²	4,8 x 10 ³	Pos 10 ⁰ g Neg 10 ⁻¹ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
25	C	1,2 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	1,2 x 10 ⁴	Pos 10 ⁻² g Neg 10 ⁻³ g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
26	C	1,8 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	< 10 ²	1,5 x 10 ⁴	Pos 10 ⁻¹ g Neg 10 ⁻² g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10
27	C	1,8 x 10 ⁵	9,7 x 10 ³	< 10 ²	9,7 x 10 ³	Pos 10 ⁻¹ g Neg 10 ⁻² g	Neg 10 ⁰ g	< 10 ²	Neg 25 g	Neg 10 ⁻¹ g	< 10

¹ A, B e C representam as três marcas comerciais analisadas; ² fungos = bolores + leveduras; Abreviaturas: Pos = positivo e Neg = negativo.

Em todas as amostras analisadas a pesquisa de microrganismos coliformes foi positiva, apresentando resultados que variam entre pesquisa positiva em 10^0 g e negativa em 10^{-3} g ($1-10^3/g$).

Todas as amostras analisadas apresentaram a pesquisa de *Escherichia coli* negativa em 10^0 g ($<1/g$).

Nenhuma das amostras continha *Staphylococcus aureus* na mais baixa diluição analisada, de modo que os resultados das contagens se expressam como $<10^2$ CFU/g.

Todas as amostras analisadas apresentaram pesquisa negativa de *Salmonella* em 25 g.

Em todas as amostras analisadas a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi negativa em 10^{-1} g ($<10/g$).

Nenhuma das amostras continha *C.perfringens* na mais baixa diluição examinada, de modo que os resultados das contagens se expressam como <10 CFU/g.

4.2) Resultados por Parâmetro Microbiológico

Com o propósito de comparar resultados, apresentam-se também figuras (Fig.1 a Fig.4) em que se relacionam valores de determinações microbiológicas para as três especiarias.

Contagens médias totais (CFU/g)

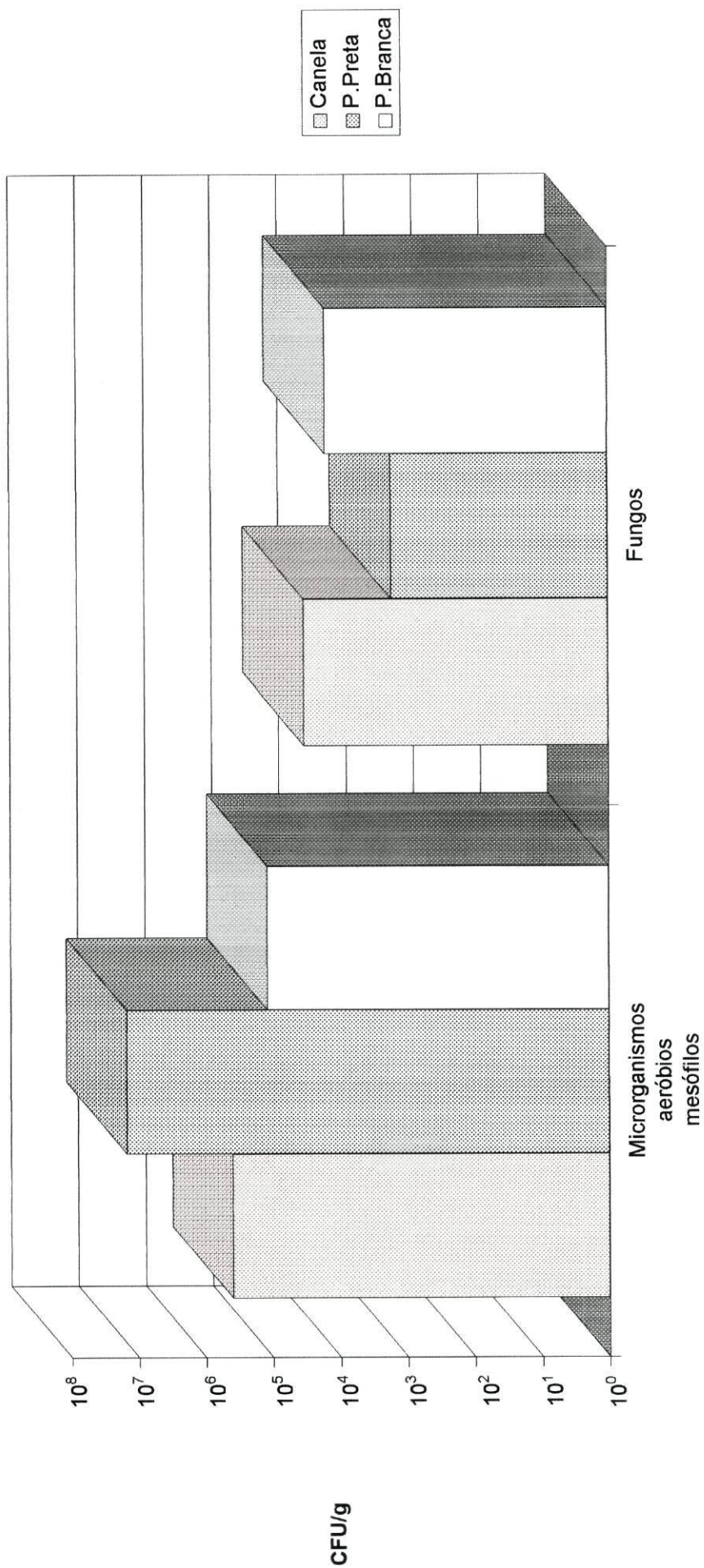


FIGURA 1

Pesquisa de coliformes

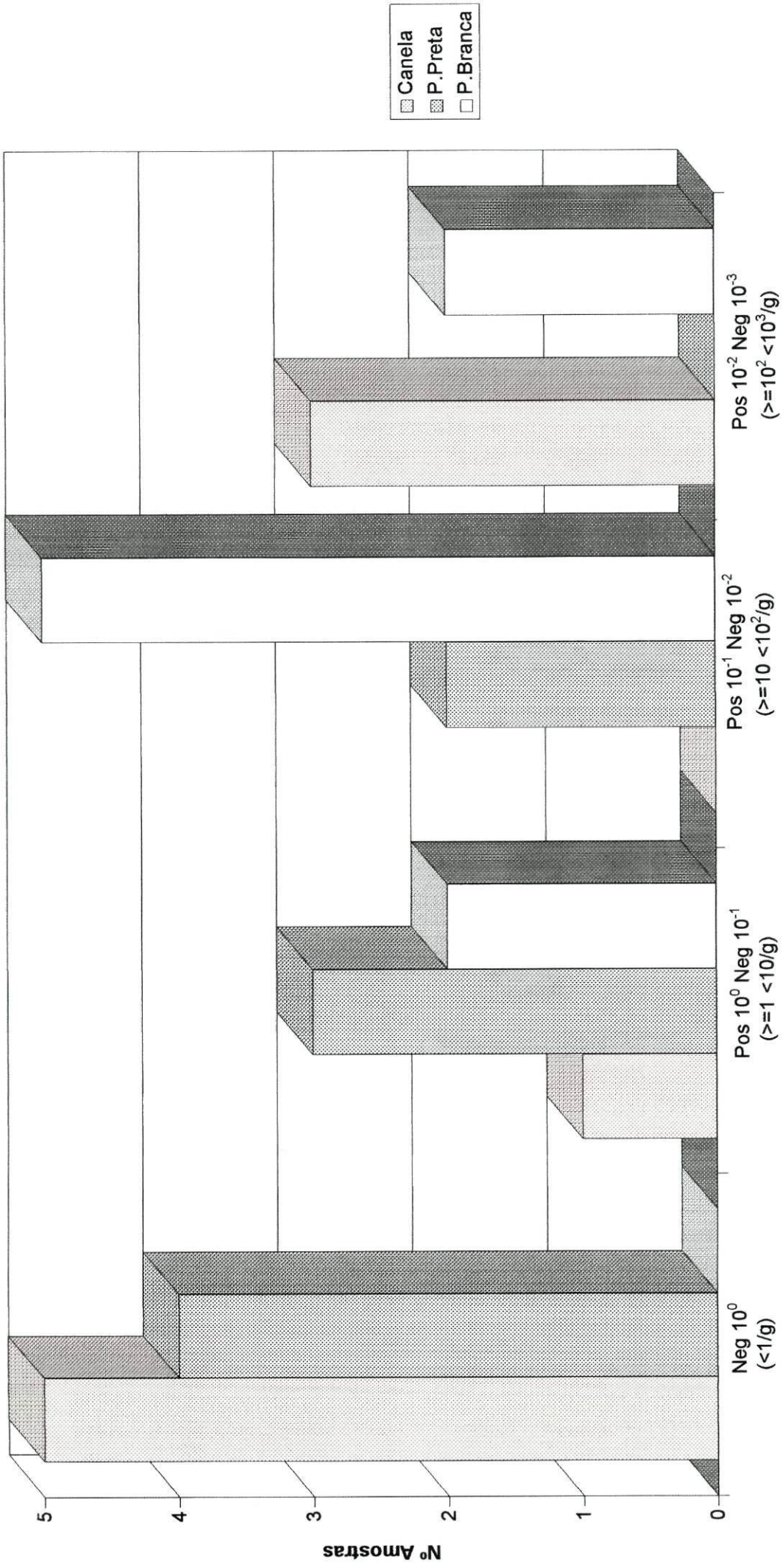


FIGURA 2

Pesquisa de Clostrídios sulfito-redutores

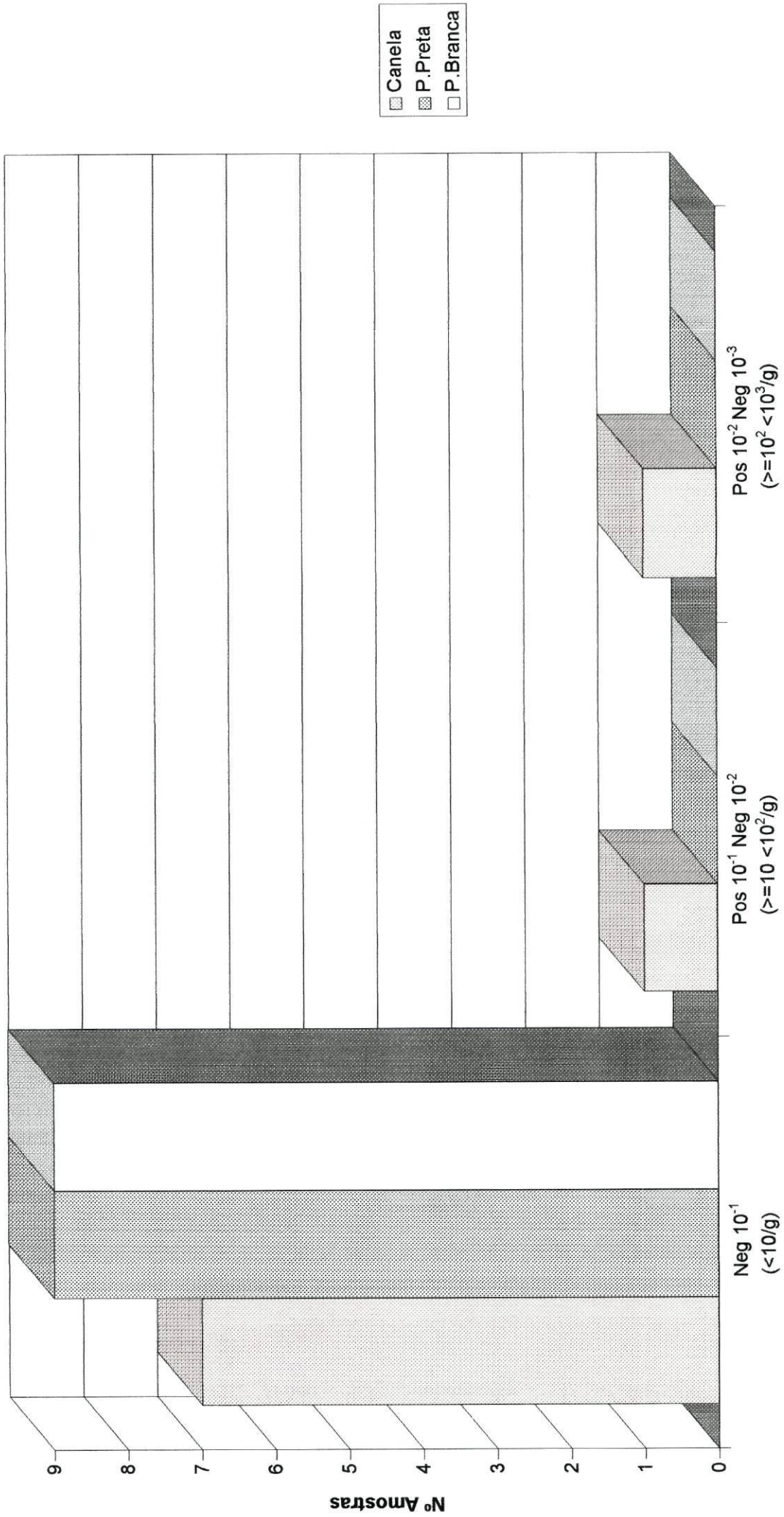


FIGURA 3

Amostras positivas (%)

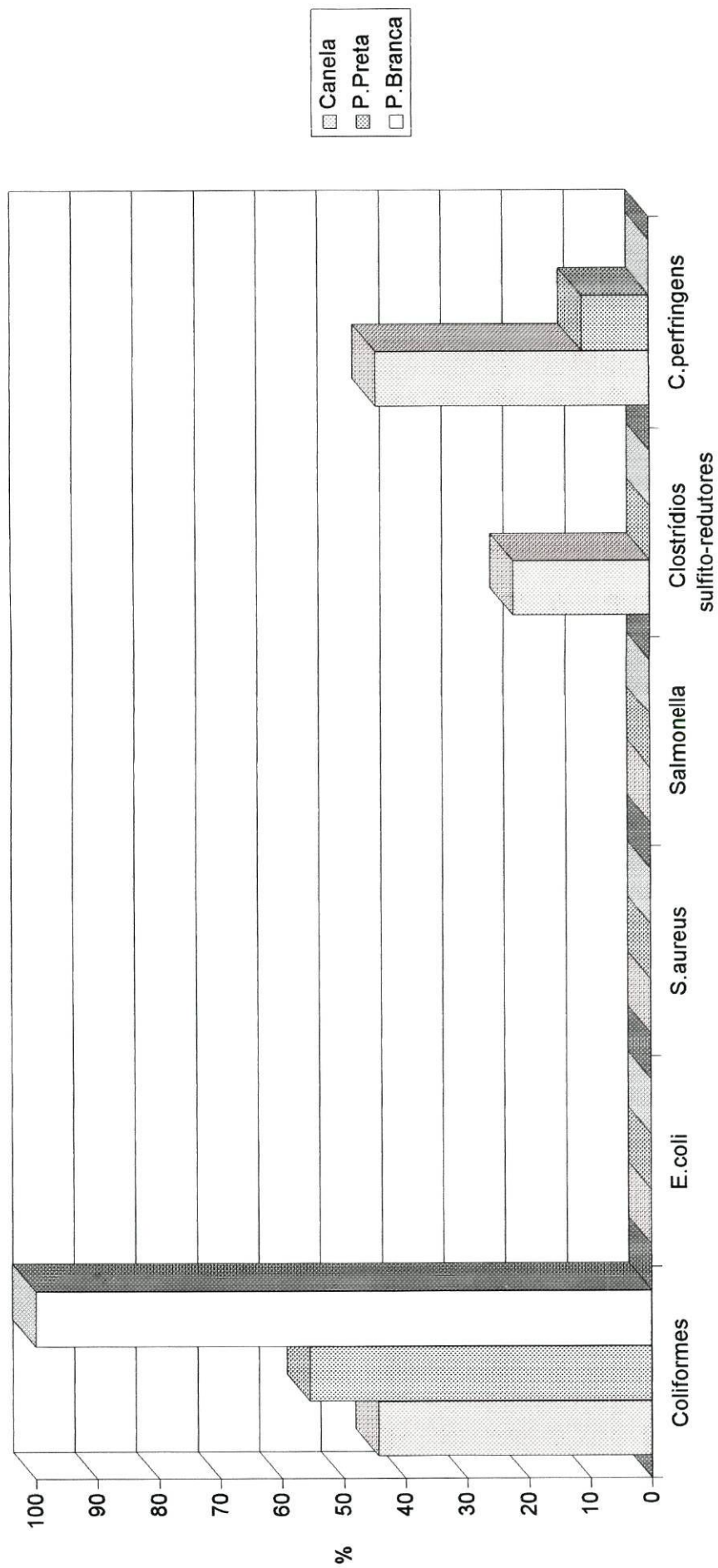


FIGURA 4

5) DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A presença de microrganismos (bactérias, bolores e leveduras) nos alimentos não constitui necessariamente um indicador de risco para a saúde do consumidor ou de qualidade inferior do produto (ICMSF, 1988).

É evidente que, tal como outros produtos agrícolas, as especiarias são expostas e acumulam populações microbianas mistas de acordo com vários factores, nomeadamente, a planta de origem (a pimenta é obtida de grãos de *Piper Nigrum L.*, e a canela é proveniente da cortiça retirada na sua maior parte da casca externa seca do *Cinnamomum*), o solo e as condições climáticas do local onde ocorre o seu desenvolvimento biológico (ICMSF, 1980; ICMSF, 1986; Madrid, 1986; Guarino et al, 1992). Por outro lado, a qualidade microbiológica de especiarias reflecte a situação higiénica da região de que são originárias, podendo as más condições sanitárias de colheita, secagem e armazenamento ser também fonte de contaminação microbiana (Pafumi, 1986; Satchell et al, 1989; Kneifel et al, 1994). Muitas das especiarias importadas são produzidas e fabricadas em regiões onde certas doenças de origem bacteriana, como febre tifóide, disenteria e cólera, são endémicas (Pafumi, 1986).

As especiarias contêm, geralmente, grande número de bactérias e bolores, com capacidade de sobrevivência durante longos períodos de tempo em alimentos secos, uma vez que as condições de manipulação após colheita permitem uma contaminação extensiva e o crescimento microbiano; no entanto, estas características poderão ser atenuadas pela secagem, processo que reduz a população microbiana (ICMSF, 1986).

5.1) Contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos

À semelhança de outros estudos sobre especiarias (Julseth et al, 1974;

Baxter et al, 1982; Schwab et al, 1982; Kneifel et al, 1994), o número de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados varia consideravelmente com a especiaria em questão.

No entanto, de acordo com os Padrões Bacteriológicos de Alimentos Portugueses para condimentos desidratados, propostos por Ribeiro em 1974, todas as amostras analisadas de canela, pimenta preta e pimenta branca ultrapassam o limite de 10^4 CFU/g.

Na pimenta preta, as contagens totais de aeróbios mesófilos apresentam valores muito elevados, da ordem de 10^7 CFU/g, o que está de acordo com outros estudos efectuados recentemente (Delcourt et al, 1994; Ito et al, 1994; Kneifel et al, 1994; Polónia et al, 1996). Já em 1967, Christensen et al. verificaram que amostras de pimenta preta apresentavam contagens que variaram entre 8.3×10^6 e 7×10^8 CFU/g, sendo a média de 1.94×10^8 CFU/g. Mais tarde, Julseth et al. (1974), Baxter et al. (1982), Pafumi (1986) e Satchell et al. (1989) encontraram resultados semelhantes, mas referentes a especiarias distribuídas a granel, antes da sua venda a retalho. No entanto, estes resultados poderão ser considerados sobreponíveis aos do presente estudo, uma vez que as especiarias comercializadas em Portugal não sofrem qualquer tipo de tratamento antes de serem colocadas no mercado. Por outro lado, Schwab et al (1982), num estudo realizado em especiarias vendidas a retalho, verificaram que as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos nas amostras de pimenta preta foram em média de 8.2×10^5 CFU/g.

Na pimenta branca e na canela, encontram-se no trabalho valores menores, da ordem de 10^4 - 10^5 CFU/g, o que também está de acordo com a literatura (Powers et al, 1975; Baxter et al, 1982; Schwab et al, 1982; Pafumi, 1986; Satchell et al, 1989; Delcourt et al, 1994; Kneifel et al, 1994; Polónia et al, 1996).

Relativamente a outras especiarias, a pimenta é das que se encontra mais

contaminada (Julseth et al, 1974; Pafumi, 1986; Farkas, 1992; Macrae et al, 1993; Delcourt et al, 1994; Kneifel et al, 1994). No entanto, verifica-se pelas amostras analisadas neste estudo que há uma grande diferença no grau de contaminação microbiana entre a pimenta preta e a pimenta branca, sendo esta última a menos contaminada. Esta situação é também comparável a resultados obtidos por outros autores (Pafumi, 1986; Satchell et al, 1989; Delcourt et al, 1994; Kneifel et al, 1994).

As menores contagens totais apresentadas pela pimenta branca podem ser atribuídas às diferenças no método de colheita: enquanto a pimenta preta é obtida de grãos verdes não maduros fervidos algumas vezes, antes do processo de secagem ao sol (no decurso deste procedimento o grão escurece), os grãos de pimenta branca são colhidos ligeiramente mais tarde, quando já estão maduros, e deixados em água, durante 7 dias, para remoção do pericarpo e de outros tegumentos antes de serem secos ao sol. Esta remoção da parede externa permite eliminar muitos microrganismos, uma vez que a contaminação com esporos está confinada à superfície externa dos grãos de pimenta; o parênquima interno pode ser considerado livre de microrganismos (Madrid, 1986; Pafumi, 1986; Satchell et al, 1989; Macrae et al, 1993; Delcourt et al, 1994; Kneifel et al, 1994).

A presença de microrganismos aeróbios mesófilos pode não ter um significado evidente em termos de riscos para a saúde pública, mas pode contribuir, até certo ponto, para a deterioração de um produto em que a especiaria seja incorporada (Powers et al, 1975). A avaliação da população microbiana aeróbia mesófila total constitui um índice de qualidade sanitária do produto, apesar de não haver correlação directa entre o número de microrganismos totais e a presença de microrganismos patogénicos. O estudo generalizado deste parâmetro deve-se ao facto de um alimento com uma população microbiana muito abundante, ser considerado impróprio para consumo (ICMSF, 1988; Bourgeois, 1991).

5.2) Contagem de Bolores e Leveduras

A grande maioria das amostras analisadas de canela, pimenta preta e pimenta branca não apresentam leveduras entre a sua população fúngica, sendo os bolores os principais responsáveis pelas contagens de fungos. Esta situação é comparável a resultados obtidos por outros autores (Baxter et al, 1982; Kneifel et al, 1994).

O crescimento das leveduras é limitado quando a actividade da água (a_w) é baixa, o que faz da desidratação uma forma de proteger o género alimentício deste tipo de contaminantes (Belin, 1990). Por outro lado, apesar da humidade ter também grande influência sobre o desenvolvimento dos bolores e a germinação dos seus esporos, há alguns grupos xerófilos, como *Aspergillus*, que conseguem crescer com baixa disponibilidade de água podendo, portanto, contaminar alimentos secos. Além disso, estes microrganismos têm capacidade para se disseminar facilmente e para sobreviver em condições pouco favoráveis, o que torna a maioria dos alimentos susceptível a alterações por bolores (Moreau, 1990). Em geral, os bolores requerem valores de a_w mais baixos do que as leveduras e as bactérias (Mescle & Zucca, 1990).

À semelhança de outros estudos (Julseth et al, 1974; Schwab et al, 1982; Pafumi, 1986; Garrido et al, 1992; Kneifel et al, 1994), o número de fungos varia com a especiaria analisada.

No estudo de Delcourt et al (1994), relativo a pimenta preta e a pimenta branca, encontra-se relação entre o grau de contaminação bacteriana e fúngica, verificando-se que a pimenta preta se apresenta mais contaminada do que a pimenta branca relativamente a todos os parâmetros estudados. No entanto, no presente trabalho, não existe correlação entre as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e as contagens de fungos, tal como nos estudos de Julseth et al

(1974), Powers et al (1975) e Baxter et al (1982). Pode-se dizer que o crescimento dos fungos nas amostras de especiarias analisadas foi totalmente independente do número total de microrganismos.

A pimenta preta apresenta os valores mais elevados relativamente a microrganismos aeróbios mesófilos, mas apresenta, nas contagens de fungos, os valores menores, da ordem de 10^2 - 10^3 CFU/g. As contagens de fungos nesta especiaria foram similares às encontradas por Ito et al (1994). No entanto, Julseth et al (1974) e Delcourt et al (1994) encontraram em amostras de pimenta preta, valores da ordem de 10^4 - 10^5 CFU/g para este parâmetro.

Na canela encontram-se os maiores valores, da ordem de 10^4 CFU/g. Os resultados de diferentes estudos para este parâmetro são muito heterogêneos (Powers et al, 1975; Schwab et al, 1982; Garrido et al, 1992); contudo, apesar da diversidade de valores encontrados, estes autores são unânimes em considerar a canela como uma das especiarias mais contaminadas com este grupo de microrganismos. Nos trabalhos de Powers et al (1975) e Schwab et al (1982), mais de metade das amostras de canela apresentam valores inferiores a 10^3 /g, mas com algumas amostras a ultrapassarem 10^5 /g e 10^3 /g, respectivamente. No estudo de Garrido et al (1992), os valores apresentados pela canela, para este parâmetro, são da ordem de 10^5 /g, o que a classifica como uma especiaria com um grau de contaminação fúngica extremamente elevado.

No trabalho, a pimenta branca apresenta valores das contagens de fungos intermédios, da ordem de 10^3 - 10^4 CFU/g. No estudo de Delcourt et al (1994), as contagens de fungos nesta especiaria foram similares, mas inferiores às das suas amostras de pimenta preta.

De acordo com os Padrões Bacteriológicos de Alimentos Portugueses para condimentos desidratados, propostos por Ribeiro em 1974, todas as amostras analisadas de canela e de pimenta branca ultrapassam o limite de 10^3 CFU/g.

Quanto à pimenta preta verifica-se que das 9 amostras, 5 (56%) apresentam contagens de fungos inferiores a esse limite, traduzindo grande variabilidade da qualidade microbiológica em função da marca comercial analisada.

A contaminação das especiarias com bolores pode dever-se ao facto de, nos países de origem, existirem óptimas condições climáticas (temperatura e humidade elevadas) para o crescimento e desenvolvimento dos bolores, além de práticas sanitárias inadequadas de colheita e conservação (Garrido et al, 1992; MacDonald et al, 1996).

No entanto, a presença de grande número de bolores, além do problema de deterioração, pode representar risco potencial de saúde pública (Pafumi, 1986), dado que algumas espécies podem produzir micotoxinas (Pafumi, 1986; Kneifel et al, 1994; MacDonald et al, 1996). Por estes motivos, a identificação dos bolores em especiarias pode ter grande significado (Baxter et al, 1982).

Segundo estudos efectuados recentemente (Garrido et al, 1992; Delcourt et al, 1994), os bolores mais frequentemente isolados de especiarias, incluindo canela, pimenta preta e pimenta branca, pertencem aos géneros *Aspergillus* (*A.flavus*, *A.niger*, *A.fumigatus*, *A.ochraceus*, *A.glaucus*, *A.nidulans*) e *Penicillium*, verificando-se que este último predomina na canela (Garrido et al, 1992).

Verifica-se que a população de bolores isolada é constituída principalmente por espécies que são agentes de aspergilose broncopulmonar, patologia que predomina em indivíduos com diminuição das suas defesas imunológicas (Delcourt et al, 1994). A contaminação da pimenta com *Aspergillus spp* poderá ser uma causa potencial de aspergilose pulmonar para doentes imunodeprimidos, como demonstram alguns trabalhos (Eccles et al, 1992).

Por outro lado, algumas espécies de *Aspergillus*, nomeadamente *A.flavus* e *A.parasiticus*, têm capacidade para sintetizar aflatoxinas que são compostos altamente carcinogénicos (Tabata et al, 1993; MacDonald et al, 1996).

Delcourt et al (1994) verificaram que todas as amostras analisadas de pimenta preta e de pimenta branca continham aflatoxinas B1, mesmo sem se detectarem estirpes de *Aspergillus*. Assim, estes autores propõem a detecção de aflatoxina B1 como um critério necessário para incluir nos parâmetros microbiológicos de apreciação da qualidade de pimentas.

No estudo de Tabata et al (1993) realizado em 564 amostras de especiarias, verificou-se que a pimenta branca foi uma das especiarias em que foram encontradas aflatoxinas (13% das amostras), não havendo amostras positivas na canela e na pimenta preta. No estudo de Aziz et al (1991) foram detectadas aflatoxinas em amostras de pimenta preta e de pimenta branca, sendo o *A. flavus* e o *A. parasiticus* os bolores mais frequentemente isolados. Estes autores concluíram que a contaminação de produtos cárneos processados estava correlacionada com a adição de especiarias, como ingredientes, à carne fresca. Martinez et al (1988) concluíram que as especiarias podem estar associadas com risco para a saúde, se forem utilizadas em alimentos com condições que favoreçam o crescimento e a produção de aflatoxinas, por bolores.

No entanto, MacDonald et al (1996) verificaram que todas as amostras de pimenta tinham aflatoxinas, mas em pequena quantidade. Isto levou os autores a afirmarem que seria possível que alguns constituintes destas especiarias tivessem capacidade para inibir ou reduzir o crescimento de bolores e a produção de aflatoxinas. Outros autores (Majerus et al, 1985) concluíram que não existe correlação entre o grau de contaminação microbiana e a concentração de aflatoxinas nas especiarias. O estudo de Llewellyn et al (1992) mostra que as especiarias não são o substrato ideal para a formação de aflatoxinas; aliás, especiarias como a canela e a pimenta parecem possuir substâncias que podem inibir completamente o crescimento de bolores e a produção de aflatoxinas.

MacDonald et al (1996) concluíram que não há diminuição considerável de aflatoxinas no alimento contaminado, após cozedura doméstica, tradicional ou em aparelhos de micro-ondas.

A presença de aflatoxinas em alimentos é um dos problemas mais graves de segurança alimentar, de tal modo que para reduzir o risco de contaminação muitos países regulamentaram os níveis máximos permitidos de aflatoxinas (Tabata, 1993).

5.3) Pesquisa de Coliformes

A pesquisa de coliformes e de *E.coli* é muito utilizada para controlar a qualidade dos produtos alimentares, uma vez que são indicadores de contaminação fecal, podendo correlacionar-se com a presença de microrganismos patogénicos de origem intestinal (Catsaras, 1991).

No presente trabalho, foram detectadas bactérias coliformes nos três tipos de especiarias analisadas (canela, pimenta branca e pimenta preta), o que está de acordo com o referenciado por outros autores (Powers et al, 1975; Schwab et al, 1982; Pafumi, 1986; Satchell et al, 1989; Ito et al, 1994).

No entanto, o número de amostras positivas para coliformes variou com a especiaria e com a marca comercial. Por outro lado, nem todas as amostras positivas excederam o limite de "ausência de coliformes em 0.1 g", proposto por Ribeiro em 1974 (segundo a NP 4129 de 1994, este limite pode converter-se em "inferior a 10 coliformes por grama").

Na canela, das 4 amostras em que a pesquisa de coliformes foi positiva, apenas as 3 amostras da marca A ultrapassam o limite, apresentando valores que variam entre 10^2 e $10^3/g$.

Na pimenta preta, apenas duas (marca C) das cinco amostras positivas para coliformes ultrapassam o limite, apresentando valores que variam entre 10 e $10^2/g$.

Assim, verifica-se que a maioria das amostras de canela e de pimenta preta apresentam a pesquisa de coliformes negativa em 10^0 g (<1/g) ou negativa em 10^{-1} (<10/g).

Quanto à pimenta branca, todas as amostras apresentam pesquisa de coliformes positiva, sendo 7 (78%) as que excedem o limite proposto, apresentando valores que variam entre 10 e 10^3 /g.

A presença de baixo número de coliformes em canela é uma situação que está de acordo com outros estudos (Powers et al, 1975; Schwab et al, 1982; Pafumi, 1986), apesar de alguma diversidade de valores encontrados. Já a pimenta branca e a pimenta preta são das mais contaminadas com este grupo de microrganismos chegando a ultrapassar 10^3 /g (Pafumi, 1986; Satchell et al, 1989). No estudo de Schwab et al (1982), apesar da grande maioria das amostras de canela e de pimenta preta apresentarem valores baixos de coliformes, aparecem duas amostras de pimenta preta e uma de canela com contagens superiores a 10^6 /g e 10^5 /g, respectivamente.

O grupo dos coliformes não apresenta uma especificidade tão elevada como a *E.coli* relativamente a índice de contaminação fecal. No entanto, a *E.coli* é um microrganismo vulnerável às condições ambientais e aos tratamentos industriais, não sendo um indicador muito fiável em alimentos desidratados (Catsaras, 1991).

5.4) Pesquisa de *Escherichia coli*

Em todas as amostras de canela, pimenta preta e pimenta branca em que se procedeu à pesquisa de *Escherichia coli*, esta foi negativa em 10^0 g, o que está de acordo com os critérios microbiológicos propostos por Ribeiro (1974). No estudo de Julseth et al (1974), também não foram detectados indicadores de contaminação fecal, pelo que a ocorrência de *E.coli* em especiarias foi considerada rara. Esta ausência de *E.coli* em especiarias pode dever-se à sensibilidade desta

bactéria à secagem (Julseth et al, 1974). A *E.coli* é sem dúvida a mais específica de todas as bactérias indicadoras de contaminação de origem fecal em alimentos, pois é um habitante normal do intestino do Homem e de animais (ICMSF, 1988). No entanto, é uma bactéria pouco resistente em determinados tipos de alimentos, como os desidratados (Catsaras, 1991). Powers et al (1975) também não encontraram coliformes fecais, na mais baixa diluição analisada das especiarias.

No entanto, outros autores (Schwab et al, 1982; Pafumi, 1986 e Satchell et al, 1989) detectaram *E.coli* em algumas amostras de canela, pimenta preta e pimenta branca. No estudo de Pafumi (1986), a pimenta preta e a pimenta branca apresentaram os maiores níveis de contaminação; das cerca de 30% que estavam contaminadas com esta bactéria algumas amostras atingiram valores superiores a 1.1×10^3 /g. No estudo realizado por Satchell et al (1989), além de se ter identificado *E.coli* em algumas amostras de pimenta preta e de pimenta branca, foram isolados na maior parte dessas amostras, outros microrganismos de origem intestinal como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*. Em contraste, material fecal proveniente de mamíferos e aves, removido dessas especiarias, continha poucos microrganismos de origem intestinal, sendo o microrganismo predominante o *E.cloacae*; deste modo, estes autores concluíram não existir relação aparente entre a população microbiana fecal presente nas amostras analisadas e a encontrada nas fezes removidas dessas mesmas amostras.

5.5) Contagem de *Staphylococcus aureus*

Em nenhuma das amostras de canela, pimenta preta e pimenta branca se isolaram *S.aureus*, o que está de acordo com o referido noutros trabalhos (Powers et al, 1975; Baxter et al, 1982; Delcourt et al, 1994; Kneifel et al, 1994).

No entanto, Julseth et al (1974) encontraram *S.aureus*, em pequeno número, em algumas amostras de pimenta preta. Esta baixa incidência e pequeno número de *S.aureus* em especiarias pode indicar que este microrganismo não constitui um risco para a saúde e não é frequentemente encontrado neste tipo de produto (Powers et al, 1975).

Deve, contudo, realçar-se que o Homem e os animais constituem os principais reservatórios de *S.aureus*, e que este microrganismo pode facilmente disseminar-se no ambiente e contaminar os alimentos (De Buyser, 1991). No entanto, a presença de uma população microbiana competitiva nos alimentos inibe o seu crescimento (De Buyser, 1990).

5.6) Pesquisa de *Salmonella*

Nenhuma das amostras analisadas de canela, pimenta preta e pimenta branca estava contaminada com *Salmonella*, o que está de acordo com estudos noutros países (Christensen et al, 1967; Julseth et al, 1974; Delcourt et al, 1994). De acordo com Julseth et al (1974), a ausência de *Salmonella* nas 113 amostras analisadas reflete a baixa incidência e a natureza esporádica da contaminação com este grupo de microrganismos. Esta situação contrasta com outros trabalhos em que foi isolada *Salmonella* spp. em pimenta preta, pimenta branca e outras especiarias (Baxter et al, 1982; Pafumi, 1986; Satchell et al, 1989; Kneifel et al, 1994). Segundo Pafumi (1986), a frequência de contaminação de pimenta preta e de pimenta branca apresentou-se com uma incidência relativamente alta (8.2% e 1.5%, respectivamente).

Assim, a importância das especiarias como reservatórios de *Salmonella* spp. não pode ser minimizada, como o demonstram certos estudos da década de 80 em

que a prevalência de *Salmonella* em pimenta preta e outras especiarias, apresenta níveis de contaminação entre 6.7% e 13.8% (D'Aoust, 1994).

A presença de *Salmonella* spp. tem especial interesse, pois as especiarias são frequentemente adicionadas a alimentos consumidos em cru, ou a alimentos já cozinhados, o que pode criar condições de risco para a saúde (Satchell et al, 1989; D'Aoust, 1994).

Esta preocupação é justificada se tivermos em conta informações existentes sobre salmoneloses humanas resultantes do consumo de alimentos de confecção doméstica, condimentados com pimenta preta e pimenta branca (D'Aoust, 1994).

Em 1984, as investigações epidemiológicas e microbiológicas levaram Gustavsen et al a considerar a pimenta preta como a causa do surto epidémico de *S. oranienburg*, ocorrido na Noruega, após consumo de alimentos caseiros temperados com a especiaria contaminada.

Nunca antes tinham sido obtidas informações sobre surtos epidémicos de *Salmonella* causados por pimenta ou outras especiarias contaminadas. Apenas em 1974, no Canadá, Handzel et al e Severs tinham estudado casos isolados de infecções por *Salmonella* veiculadas por pimenta preta e pimenta branca, respectivamente.

No estudo acima referido, efectuado na Noruega (Gustavsen et al, 1984), o número de *Salmonella* presente na pimenta preta foi considerado baixo. Assim, atendendo a que a quantidade de pimenta consumida por pessoa é pequena, pensa-se que a pimenta preta foi responsável pela salmonelose, apenas depois de ter ocorrido multiplicação da bactéria nos alimentos temperados algum tempo antes de serem consumidos.

Apesar de não se ter isolado *Salmonella* neste trabalho, verificou-se a presença de colónias de bacilos Gram negativo em amostras de pimenta preta e de pimenta branca. Esta situação está de acordo com alguns trabalhos em que se

procedeu à identificação de grupos de bactérias Gram negativo, encontrados em especiarias. Algumas dessas especiarias, incluindo pimenta preta e pimenta branca, apresentavam números significativos de *Enterobacteriaceae*, de *Pseudomonas* spp. e de *Aeromonas* spp., que contribuíam para a carga microbiana total (Baxter et al, 1982; Satchell et al, 1989; Kneifel et al, 1994).

No estudo de Satchell et al (1989), *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* foram as *Enterobacteriaceae* mais frequentemente isoladas de todos os tipos de especiarias avaliados. No estudo de Baxter et al (1982), as *Enterobacteriaceae* mais frequentemente isoladas de especiarias pertenciam ao género *Enterobacter* (*E.cloacae* e *E.agglomerans*) e *Klebsiella* (*K.pneumoniae* e *K.ozzaenae*). As *Enterobacteriaceae* são microrganismos de origem intestinal, de modo que a sua presença pode indicar contaminação fecal (Catsaras, 1991).

5.7) Pesquisa de Clostrídios Sulfito-Redutores

Foram detectados clostrídios sulfito-redutores apenas em duas amostras de canela da marca B, apresentando valores que variaram entre 10 e 10³/g.

No entanto, essas amostras positivas excederam o limite de "ausência de clostrídios sulfito-redutores em 0.1 g", proposto por Ribeiro em 1974 (segundo a NP 4129 de 1994 este limite pode converter-se em "inferior a 10 clostrídios sulfito-redutores por grama").

Assim, verifica-se que a maioria das amostras de canela e todas as amostras de pimenta preta e de pimenta branca apresentam a pesquisa de clostrídios sulfito-redutores negativa em 0.1 g, ou seja, inferior a 10/g.

Os clostrídios sulfito-redutores são utilizados como indicadores de contaminação fecal e a sua capacidade de formar esporos confere-lhes, evidentemente, uma grande resistência (Catsaras, 1991).

5.8) Contagem de *Clostridium perfringens*

No estudo foram isolados *C.perfringens* em 4 (44%) amostras de canela e uma (11%) amostra de pimenta preta, encontrando-se valores entre 5×10 e 2×10^2 CFU/g, na canela, e de 1×10 CFU/g, na pimenta preta.

Powers et al (1975) e Pafumi (1986) encontraram elevada incidência de *C.perfringens* em amostras de canela, pimenta preta e pimenta branca. No estudo de Pafumi (1986), estas especiarias apresentavam níveis de contaminação altos, com algumas amostras a atingirem valores superiores a 1×10^3 CFU/g. No trabalho de Powers et al (1975), as contagens de *C.perfringens* na canela foram mais baixas (50-300/g), tendo sido identificado este microrganismo em 28% das amostras.

Contudo, no estudo de Kneifel (1994) apenas uma em 160 amostras de especiarias apresentava *C.perfringens*, enquanto Baxter (1982) não encontra contaminação por clostrídios.

Uma vez que o *C.perfringens* é uma bactéria produtora de esporos, responsável por toxinfecções alimentares, a sua presença em especiarias pode representar um risco potencial para a saúde (Powers et al, 1975; Pafumi, 1986; Kneifel et al, 1994).

Os esporos de *C.perfringens* podem sobreviver durante a confecção e, germinando, possibilitar o crescimento da bactéria a temperaturas entre 20 e 50° C (Powers et al, 1975; Farkas, 1992). Assim, alimentos temperados ou adornados com especiarias contaminadas, que não sejam adequadamente cozinhados e oportunamente refrigerados após confecção, para evitar o "morno", podem permitir a multiplicação da bactéria até uma dose crítica que pode causar a toxinfecção alimentar (Powers et al, 1975; Pafumi, 1986).

Por outro lado, a presença de *Bacillus cereus* em especiarias também não pode ser ignorada, pois é outra bactéria formadora de esporos, responsável por

intoxicações alimentares (Pafumi, 1986; Kneifel et al, 1994). Os riscos para a saúde devem-se à capacidade de sobrevivência dos esporos a temperaturas de confecção, o que permite que a bactéria possa crescer (Pafumi, 1986). Alguns autores (Baxter et al, 1982; Pafumi, 1986; Kneifel, 1994) detectaram *B.cereus* na maioria das especiarias analisadas, com algumas amostras a apresentarem contagens elevadas, da ordem de 10^5 CFU/g.

A contaminação das especiarias com esporos bacterianos resistentes ao calor é especialmente incómoda para os alimentos processados, pois, muitas vezes, essas especiarias contaminadas são responsáveis pela deterioração de carnes enlatadas ou podem causar defeitos em produtos de salsicharia (Farkas, 1992).

Por outro lado, o *C.perfringens* pode ser um indicador de contaminação fecal, uma vez que é um microrganismo telúrico muito espalhado na Natureza, e também presente no intestino de animais e de indivíduos saudáveis (Poumeyrol et al, 1991). Dado que é um microrganismo produtor de esporos, o que o torna muito resistente, a sua presença poderá eventualmente indicar contaminação fecal antiga.

Embora as especiarias sejam ingredientes secundários em alimentos (Julseth et al, 1974; Pafumi, 1986), desempenham um papel importante no comércio internacional (Macrae et al, 1993; Ito et al, 1994), sendo produtos muito difundidos e, mesmo, indispensáveis na alimentação actual (Madrid, 1986).

Uma vez que apresentam, frequentemente, elevada carga microbiana, as especiarias podem ser responsáveis por deterioração ou, mais raramente, por doença representando, neste caso, risco para a saúde pública quando incorporadas em produtos alimentares (ICMSF, 1980; Pafumi, 1986; Farkas, 1992). O problema microbiológico deve-se ao facto das especiarias serem, geralmente,

adicionadas a alimentos consumidos crus ou alimentos já confeccionados que não vão sofrer mais nenhum processamento (Pafumi, 1986; Munasiri et al, 1987). Além disso, são usadas como ingredientes em produtos industrializados (ICMSF, 1980; ICMSF, 1986; Farkas, 1992).

Sendo as especiarias produtos agrícolas e os esporos, quer bacterianos, quer fúngicos, ubiqüitários no solo, a presença de grande número dessas estruturas pode ser esperada (Pafumi, 1986). Os alimentos contaminados com microrganismos, como bactérias formadoras de esporos e bolores, podem proporcionar as condições necessárias para a sua multiplicação até níveis infecciosos ou tóxicos (Baxter et al, 1982; Pafumi, 1986). Por outro lado, as especiarias podem introduzir, em variados alimentos, microrganismos com capacidade potencial de deterioração (Baxter et al, 1982; Pafumi, 1986). Reconhece-se, em muitos casos, que a frequente contaminação de especiarias, especialmente com um número excessivo de bactérias formadoras de esporos e bolores, tem causado graves problemas nas indústrias alimentares, provocando, por exemplo deterioração de enlatados e carnes processadas (ICMSF, 1986; Ito et al, 1994).

Sabendo que microrganismos patogênicos como *B.cereus*, *C.perfringens*, *Salmonella spp.* e bolores toxigênicos podem ser encontrados nestes produtos torna-se necessário sujeitar as especiarias a tratamentos de descontaminação apropriados, tendo em vista a sua esterilização, ou pelo menos, a redução significativa da carga microbiana (Baxter et al, 1982; Munasiri et al, 1987; Farkas, 1992; Kneifel et al, 1994). No entanto, a deterioração e os riscos para a saúde apresentados por uma especiaria em particular devem sempre ser avaliados no contexto da sua utilização (Farkas, 1992).

Os resultados do presente estudo, principalmente os teores elevados de microrganismos aeróbios mesófilos, de coliformes e de bolores encontrados na

canela, pimenta preta e pimenta branca, e a presença de *C.perfringens* na canela e na pimenta preta, sugerem também a necessidade de melhor controlo da qualidade microbiológica de especiarias, tendo em vista reduzir a sua população microbiana.

Actualmente, o tratamento por radiações ionizantes parece ser o processo mais eficaz para descontaminar especiarias (Farkas, 1992; Ito et al, 1994; Kneifel et al, 1994). Este método permite uma redução da população microbiana para níveis satisfatórios, sem afectar outras características das especiarias, nomeadamente as propriedades sensoriais e químicas (Munasiri et al, 1987; Farkas, 1992).

Vários estudos (Munasiri et al, 1987; Sharma et al, 1989; Ito et al, 1994; Polónia et al, 1996) demonstram que canela, pimenta preta e pimenta branca, tratadas com doses recomendadas de radiação ionizante, apresentam reduções significativas da carga microbiana. No estudo de Polónia et al (1996), em especiarias comercializadas em Portugal, a dose recomendada de 10 KGy foi suficiente para reduzir a população mesófila inicial e para inactivar microrganismos potencialmente patogénicos (*E.coli*, *C.perfringens* e *Salmonella*) quando presentes.

A tecnologia da irradiação de especiarias está a ser introduzida em cada vez mais países e é incondicionalmente aceite pelo JECFI (joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, 1981) até doses de radiação média de 10 KGy, com o objectivo de controlar a infestação por insectos, ou a redução da carga microbiana e do número de microrganismos patogénicos,. Por exemplo, na Noruega, desde Setembro de 1982, altura em que ocorreu o surto de *S.oranienburg* após consumo de alimentos caseiros temperados com pimenta preta contaminada, passou a ser permitido irradiar especiarias (Gustavsen et al, 1984).

6) CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode concluir-se que as três especiarias estudadas se encontram fortemente contaminadas, apresentando contagens elevadas de microrganismos aeróbios mesófilos e de fungos. Apesar de não se terem detectado microrganismos patogénicos, como *E.coli*, *S.aureus* e *Salmonella*, encontraram-se outros microrganismos contaminantes, nomeadamente bolores, coliformes, clostrídios sulfito-redutores e *C.perfringens*.

Em função desta situação seria importante controlar cuidadosamente as condições higio-sanitárias de produção (crescimento, colheita, armazenamento e distribuição no local de origem), o processamento e a utilização alimentar (doméstica e industrial) destes produtos. Por outro lado, tendo em conta a dificuldade de obter especiarias com baixas cargas microbianas seria também urgente promover a introdução no nosso país de métodos de descontaminação que forneçam ao consumidor um produto seguro e, à indústria alimentar, ingredientes de boa qualidade microbiológica.

Por conseguinte, mais dados sobre o estado microbiológico das especiarias comercializadas em Portugal devem estar disponíveis para se poderem avaliar os riscos sanitários reais provenientes do consumo destes produtos, e para se decidir sobre a necessidade da utilização de tratamento de descontaminação.

Além disso, parece importante promover avaliações microbiológicas mais extensivas, em número de amostras e de especiarias, que para além da descrição da situação actual, possibilitem o estabelecimento de critérios microbiológicos obrigatórios, o que se traduzirá num controlo mais rigoroso da sua qualidade.

BIBLIOGRAFIA

Aziz NH, Youssef YA. Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing molds in fresh and processed meat in Egypt. *Food Additives and Contaminants* 1991; 8:321-331. Citado por McKee LH. Microbial contamination of spices and herbs: a review. *Food Science & Technology* 1995; 28:1-11.

Baxter R, Holzapfel WH. A microbial investigation of selected spices, herbs and additives in South Africa. *Journal of Food Science* 1982; 47:570-574, 578.

Belin. Les levures. In: Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J (eds). *Microbiologie Alimentaire. 1- Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. 2e éd. Technique et Documentation - Lavoisier, 1990:161-173.*

Bourgeois CM. La microflore aérobie mésophile totale. In: Bourgeois CM & Leveau JY (eds). *Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires. vol. 3. Le contrôle microbiologique. 2e éd. Technique et Documentation - Lavoisier, 1991:139-143.*

Castro A. Especiarias. In: *Dicionário Ilustrado da História de Portugal. Lisboa: Edições Alfa, vol I, 1985: 220-222.*

Catsaras MV. Les indices de contamination fécale. In: Bourgeois CM & Leveau JY (eds). *Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires. vol. 3. Le contrôle microbiologique. 2e éd. Technique et Documentation - Lavoisier, 1991:248-259.*

Christensen CM, Fanse HA, Nelson GH, Bates F, Mirocha CJ. Microflora of black and red pepper. *Applied Microbiology* 1967; 15:622-626. Citado por McKee LH. Microbial contamination of spices and herbs: a review. *Food Science & Technology* 1995; 28:1-11 e por Schwab AH, Harpestad AD, Swartzentruber A, Lanier JM, Wentz BA, Duran AP, Barnard RJ, Read RB. Microbiological quality of some spices and herbs in retail markets. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; 44:627-630.

D'Aoust JY. *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology* 1994; 24:11-31.

De Buyser ML. Les staphylocoques. In: Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J (eds). *Microbiologie Alimentaire. 1- Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. 2e éd. Technique et Documentation - Lavoisier, 1990:65-76.*

De Buyser ML. Les staphylocoques coagulase-positifs. In: Bourgeois CM & Leveau JY (eds). *Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires. vol. 3. Le contrôle microbiologique. 2e éd. Technique et Documentation - Lavoisier, 1991: 305-314.*

Delcourt A, Rousset A, Lemaître JP. Microbial and mycotoxic contamination of peppers and food safety. *Bolletino Chimico Farmaceutico* 1994; 4:235-238.

Eccles NK, Scott GM. *Aspergillus* in pepper. *The Lancet* 1992; 339:618.

Farkas J. Radiation Treatment of spices. *Prehrambeno-tehnol. Biotehnol. rev.* 1992; 30:159-163.

Garrido D, Jodral M, Pozo R. Mold flora and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in spices and herbs. *Journal of Food Protection* 1992; 55:451-452.

Godinho VM. Especiarias. In: *Dicionário de História de Portugal*, dirigido por Joel Serrão. Lisboa: Iniciativas Editoriais, vol II, 1965: 99-104.

Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira. Editorial Enciclopédia Lda; vol X, 224-225.

Guarino PA, Gray RJH. Spices and gums. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3rd ed. American Public Health Association, 1992: 961-974.

Gustavsen S, Breen O. Investigation of an outbreak of *Salmonella oranienburg* infections in Norway, caused by contaminated black pepper. *American Journal of Epidemiology* 1984; 119:806-812.

Handzel S, Laidly R, Severs D et al. *Salmonella Weltevreden* outbreak associated with contaminated pepper. *Epidemiol. Bull.* 1974; 18:80. Citado por Gustavsen S, Breen O. Investigation of an outbreak of *Salmonella oranienburg* infections in Norway, caused by contaminated black pepper. *American Journal of Epidemiology* 1984; 119:806-812.

ICMSF. Spices. In: *Microbial Ecology of Foods*. Vol. 2. Food Commodities. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Academic Press, INC, 1980: 731-751.

ICMSF. Sampling plans for spices, condiments, and gums. In: *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2nd ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Blackwell Scientific Publications, 1986: 213-216.

ICMSF. Indicator microorganisms. In: *Microorganisms in Foods 1. Their significance and methods of enumeration*. 2nd ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. University of Toronto Press, 1988: 3-14.

ISO 6579 (1993). *Microbiologie. Directives générales concernant les méthodes de recherche des Salmonella.*

Ito H, Islam S. Effect of dose rate on inactivation of microorganisms in spices by electron-beams and gamma-rays irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 1994; 43:545-550.

JECFI, Wholesomeness of Irradiated Food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. World Health Organization Technical Report Series 659, WHO, Geneva 1981. Citado por Farkas J. Radiation Treatment of spices. *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* 1992; 30:159-163.

Julseth RM, Deibel RH. Microbial profile of selected spices and herbs at import. *J. Milk Food Technol.* 1974;37:414-419.

Kneifel W, Berger E. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *Journal of Food Protection* 1994; 57:893-901.

Llewellyn GC, Mooney RL, Cheatle TF, Flannigan B. Mycotoxin contamination of spices-an update. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1992; 29:111-121. Citado por MacDonald S, Castle L. A UK retail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fate during cooking. *Food Additives and Contaminants* 1996; 13:121-128.

MacDonald S, Castle L. A UK retail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fate during cooking. *Food Additives and Contaminants* 1996; 13:121-128.

Macrae R, Robinson R, Sadler M. Spices and flavouring crops. In: *Encyclopaedia of Food Technology and Nutrition*. Academic Press, 1993: 4282-4319.

Madrid A. Condimentos y especias en la alimentación. In: *Manual de industrias alimentarias*. A.M.V. ediciones, 1986: 542-551.

Majerus P, Woller R, Leevivat P, Klintrimas T. Gewurze-schimmelbefall und gehalt an aflatoxinen, ochratoxin A und sterigmatocystin. *Fleischwirtschaft* 1985; 65:1155-1158. Citado por McKee LH. Microbial Contamination of Spices and Herbs: a review. *Food Science & Technology* 1995; 28:1-11.

Martinez P, Jodral M, Garrido MD, Jordano R, Pozo R. Identification of toxigenic *Aspergillus flavus* in commercial spices. *Alimentaria* 1988; 189:85-86. Citado por McKee LH. Microbial Contamination of Spices and Herbs: a review. *Food Science & Technology* 1995; 28:1-11.

McKee LH. Microbial contamination of spices and herbs: a review. *Food Science & Technology* 1995; 28:1-11.

Mescle JF, Zucca J. Le comportement des microorganismes em milieu alimentaire. In: Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J (eds). *Microbiologie Alimentaire*. 1- Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. 2e éd. Technique et Documentation - Lavoisier, 1990:20-24.

Moreau C. Les moisissures. In: Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J (eds). *Microbiologie Alimentaire*. 1- Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. 2e éd. Technique et Documentation - Lavoisier, 1990:174-185.

Munasiri MA, Parte MN, Ghanekar AS, Sharma A, Padwal-Desai SR, Nadkarni GB. Sterilization of ground prepacked Indian spices by gamma irradiation. *Journal of Food Science* 1987; 52:823-826.

NP 870 (1988). *Microbiologia Alimentar*. Alimentos para animais. Pesquisa de *Salmonella*.

NP 1047 (1974). *Especiarias*. Definição e Nomenclatura.

NP 1828 (1982). *Microbiologia Alimentar*. Colheita de amostras para análise microbiológica.

NP 1829 (1982). *Microbiologia Alimentar*. Preparação da amostra para análise microbiológica.

NP 1933 (1982). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de *Salmonella*.

NP 1995 (1982). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de microorganismos a 30° C.

NP 2079 (1989). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para análise microbiológica.

NP 2164 (1983). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para pesquisa de bactérias coliformes.

NP 2261 (1986). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a contagem de *Clostridium perfringens*.

NP 2262 (1986). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores.

NP 2308 (1986). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de *Escherichia coli*.

NP 3005 (1985). Microbiologia Alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica.

NP 3277-1 (1987). Microbiologia Alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25° C.

NP 4129 (1994). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a elaboração de critérios de apreciação dos resultados de análises microbiológicas.

NP 4196 (1992). Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a contagem de *Staphylococcus aureus* a 37° C.

Oliveira MB, Ferreira M. A utilização das plantas aromáticas e medicinais. Alimentar 1994; 37:17-20.

Pafumi J. Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. Journal of Food Protection 1986; 49:958-963.

Peres E. Cozinha saudável. In: Alimentos & Alimentação. Porto: Lello & Irmão, Editores, 1992: 72-81.

Polónia I, Esteves MP, Trigo MJ, Andrade ME, Empis E. Irradiação: um método eficiente de descontaminar especiarias; II Jornadas das Indústrias Agro-Alimentares, Lisboa; 1996 (abst.).

Poumeyrol M, Billon J. Le genre *Clostridium* et les microorganismes anaérobies sulfito-réducteurs. In: Bourgeois CM & Leveau JY (eds). Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires. vol. 3. Le contrôle microbiologique. 2e éd. Technique et Documentation - Lavoisier, 1991:139-143.

Powers EM, Lawyer R, Masuoka Y. Microbiology of processed spices. J. Milk Food Technol. 1975;38:683-687.

52

Ribeiro AMR. Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. Rev. Microbiol. (S.Paulo) 1974; 5(1): 17-25.

Rogers J. Herbs and spices. In: The Encyclopedia of Food and Nutrition. London: Merehurst, 1990: 338-363.

Satchell FB, Bruce VR, Allen G, Andrews WH, Gerber HR. Microbiological survey of selected imported spices and associated fecal pellet specimens. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 1989; 72(4):632-637.

Schwab AH, Harpestad AD, Swartzentruber A, Lanier JM, Wentz BA, Duran AP, Barnard RJ, Read RB. Microbiological quality of some spices and herbs in retail markets. Applied and Environmental Microbiology 1982; 44:627-630.

Severs D. *Salmonella* food poisoning from contaminated White pepper. Epidemiol. Bull. 1974; 18:80. Citado por Gustavsen S, Breen O. Investigation of an outbreak of *Salmonella oranienburg* infections in Norway, caused by contaminated black pepper. American Journal of Epidemiology 1984; 119:806-812.

Sharma A, Padwal-Desai SR, Nair PM. Assessment of microbiological quality of some gamma irradiated Indian spices. Journal of Food Science 1989; 54:489-490.

Tabata S, Kamimura H, Ibe A, Hashimoto H, Iida M, Tamura Y, Nishima T. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo:1986-1990. Journal of AOAC International 1993; 76:32-35.

Tannahill R. In: Food in History. Penguin Books, 1988.