

ANÁLISE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *SALMONELLA* SP. EM AMOSTRAS DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

*ANALYSIS OF FECAL COLIFORM AND SALMONELLA SP. IN SAMPLES MINIMALLY
PROCESSED VEGETABLES*

Renan Bazuco FRITTOLE^{1,2}; Luiz Henrique RODRIGUES¹

¹Centro Universitário Hermínio Ometto (UNIARARAS)

²Mestrando em Ciências (Saúde da Criança e do Adolescente) - UNICAMP

Autor responsável: Renan Bazuco Frittoli. Endereço: Rua das Acácias, n. 82, Inocoop. Mogi Mirim
– SP. CEP. 13806-532. E-mail: renanbazuco@hotmail.com

RESUMO

O consumo de vegetais minimamente processados tornou-se bastante popular nos dias de hoje, pois se encontram disponíveis higienizados e embalados. Etapas de processamento, como a picagem e o corte, normalmente aumentam a população de micro-organismos, diminuindo, conseqüentemente, a vida de prateleira do alimento. Mesmo que os micro-organismos potencialmente patogênicos estejam ausentes, um número elevado de micro-organismos pode indicar que o alimento é insalubre. Para avaliar a qualidade sanitária desses alimentos, a legislação brasileira estabelece limites na contagem de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de 20 amostras de hortaliças minimamente processadas comercializadas na cidade de Araras (SP) de acordo com o padrão microbiológico estabelecido pela Portaria n. 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA. A metodologia fundamentou-se nas técnicas descritas por Silva; Junqueira e Silveira (2001). Verificou-se que 35% das amostras apresentaram contagem de coliformes termotolerantes acima do estabelecido pela legislação. Contagens elevadas de coliformes totais também foram encontradas nos produtos (65%), indicando condições inadequadas de higiene durante o processamento, comprometendo, assim, sua qualidade microbiológica. No presente trabalho não se detectou a presença de *Salmonella* sp. nas amostras. Concluiu-se que é necessário maior controle de qualidade desses alimentos, desde a colheita da matéria-prima até o seu

consumo, principalmente durante etapas de corte e fatiamento, fazendo-se necessário adotar um sistema efetivo de controle, de forma a garantir um produto saudável e seguro para o consumidor.

Palavras-chave: Controle de Qualidade; Hortaliça Minimamente Processada; Coliformes; *Salmonella* sp.

ABSTRACT

The minimally processed vegetables consumption has become quite popular nowadays, because they are already cleaned and packaged. Processing steps such as cutting and chipping usually increase the population of microorganisms, consequently reducing food shelf life. Even though potentially pathogenic microorganisms are absent, a large number of microorganisms can indicate that food is unhealthy. To evaluate the sanitary quality of these foods, the Brazilian legislation establishes limits on the count of thermotolerant coliforms and *Salmonella* sp. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of 20 samples of minimally processed vegetables sold in the city of Araras (SP) according to microbiological standard established by resolution n. 12 of January 2, 2001 - ANVISA. The method was followed according to the techniques described by Silva; Junqueira e Silveira (2001). It was found that 35% of the samples had fecal coliform counts above the established by law. High counts of total coliforms were also found in the products (65%), indicating inadequate hygienic conditions during processing, storage and compromising their microbiological quality. In the present study was not

detected the presence of *Salmonella* in any sample. It follows that it is necessary a greater quality control in these foods, from harvesting of the raw material to its consumption, especially during stages of cutting and slicing, making it necessary to adopt an effective system

INTRODUÇÃO

A preocupação do homem com a qualidade e a segurança dos alimentos cresce consideravelmente a cada ano. É por isso que na escolha dos alimentos os consumidores cada vez mais levam em consideração os riscos alimentares que os produtos podem oferecer (CHINNICI, D'AMICO, PECORINO, 2002).

O mercado de produtos hortícolas frescos é um exemplo de alimento passível de preocupação (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). Atualmente, com a tendência ao consumo das hortaliças minimamente processadas, a preocupação com riscos de natureza microbiológica torna-se acentuada, pois muitas operações, como corte, lavagem e embalagem são feitas manualmente, aumentando o risco de contaminações dos produtos (GOPAL et al., 1999).

A contaminação das hortaliças por patógenos pode acontecer em diversas etapas. Em certas práticas de cultivo, a contaminação pode ocorrer por meio da utilização de águas contaminadas durante o processo de irrigação, emprego de resíduos orgânicos como fertilizante, exposição a insetos ou uso de esterco animal que não sofreu compostagem (PACHECO et al., 2002). A contaminação também pode ocorrer por meio de más condições de transporte e comercialização (BEUCHAT, 2002).

Segundo Cruz; Cenci; Maia (2006), além da escolha adequada da matéria-prima, se não houver higiene, tanto dos manipuladores como do local e do equipamento envolvido nesse processo, esses alimentos podem representar perigo para os consumidores, principalmente durante as operações de corte e fatiamento.

Um dos parâmetros indicadores utilizados para verificar as condições de higiene de hortaliças minimamente processadas é a contagem de *Salmonella* sp. e de Coliformes termotolerantes (BRASIL, 2001).

A *Salmonella* sp. é um importante gênero de micro-organismo responsável por

of control in order to ensure healthy and safe product for the consumer.

Keywords: Quality Control; Minimally Processed Vegetable; Coliforms; *Salmonella* sp.

intoxicações alimentares, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. A maioria dos sorotipos desse micro-organismo é patogênica ao ser humano, apresentando diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade do indivíduo infectado e da resposta imunológica (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994).

As contagens de coliformes em hortaliças são utilizadas como parâmetros indicadores de higiene (BRASIL, 2001). O índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas e os coliformes termotolerantes são utilizados como indicadores da qualidade sanitária do alimento, servindo também como indicadores da presença de micro-organismos patogênicos (OLIVEIRA, 2005).

Os coliformes totais compõem os grupos de bactérias Gram-negativas que não originam esporos e fermentam a lactose, produzindo ácido e gás à 35/37°C. Este grupo é formado por um conjunto de bactérias que inclui os gêneros *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp. e *Erwinia* sp. Já os coliformes termotolerantes são também conhecidos como “coliformes fecais” e suportam uma temperatura superior a 40°C. No grupo de coliformes termotolerantes está presente a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, que, ao ser ingerida pelo homem, pode resultar em sintomas desagradáveis, brandos ou agressivos, dependendo do grau de contaminação (CRUZ; CENCI; MAIA, 2006).

Deste modo, faz-se necessário que esses alimentos sejam cortados higienicamente, passem por procedimentos rigorosos de sanificação, possuam embalagens apropriadas e sejam transportados em baixas temperaturas (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. em amostras de hortaliças minimamente processadas comercializadas em

diferentes supermercados na cidade de Araras-SP e verificar se as amostras se encontravam de acordo com o padrão microbiológico estabelecido pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

MATERIAIS E MÉTODOS

Analisaram-se 20 amostras de hortaliças minimamente processadas no período de janeiro a setembro de 2013, entre elas: 4 amostras de alface (*Lactuca Sativa*), 4 amostras de repolho (*Brassicaoleracea variedade capitata*), 4 amostras de acelga (*Beta vulgaris*), 4 amostras de cenoura (*Daucuscarota*) e 4 amostras de couve (*Brassicaoleracea variedade acephala*), adquiridas em três estabelecimentos comerciais (supermercados) localizados na cidade de Araras-SP e, posteriormente, transportadas ao laboratório de microbiologia de alimentos da FHO|UNIARARAS. Pesquisou-se nesses alimentos a presença de *Salmonella* sp e Coliformes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da FHO|UNIARARAS, registro n. 049/2011.

Todas as metodologias empregadas nas análises microbiológicas foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Silva; Junqueira e Silveira (2001). Para a análise de coliformes, pesaram-se alíquotas de 10 gramas (g) da amostra e adicionaram-se 90 mililitros (mL) de água peptonada 0,1% (peptona bacteriológica), obtendo-se a diluição 10^{-1} . A seguir realizaram-se as diluições decimais seriadas até obter-se a diluição 10^{-3} .

Partindo das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , pipetou-se 1 mL das respectivas diluições para uma série de três tubos contendo 10 mL do Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e um tubo de Durham invertido e incubou-se em estufa a 37°C por 48 horas. Para a contagem de coliformes

totais, transferiu-se uma alçada de todos os tubos de LST (com produção de gás) para tubos contendo 10 mL de Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% (VB) e tubos de Durham invertidos, incubando-os a 37°C por 48 horas.

Para a contagem de coliformes termotolerantes, transferiu-se uma alçada de cada tubo considerado positivo no Caldo VB para tubos contendo 10 mL do Caldo *Escherichia Coli* (Caldo EC). Incubaram-se os tubos em banho-maria a $44,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Consideraram-se como positivos para coliformes termotolerantes todos os tubos que continham formação de gás no interior do tubo de Durham.

Para a detecção de *Salmonella* sp., pesaram-se 25 g da amostra e adicionaram-se 225 mL de caldo lactosado, incubando-os em uma estufa a 37°C por 20 horas (mistura pré-enriquecida). Da mistura pré-enriquecida, transferiu-se 0,1 mL para um tubo contendo 10 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), sendo este mantido em banho-maria a 42°C por 24 horas. A partir do caldo RV, realizou-se o plaqueamento seletivo diferencial pela técnica de esgotamento em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), incubando-se em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C .

RESULTADOS

Todas as amostras de hortaliças minimamente processadas (n=20) apresentavam-se em embalagens intactas. A média de validade dos produtos foi de 2,15 dias (DP \pm 0,35) [IC95%: 1,98 – 2,31]. Do total das amostras, 35% (n=7) encontravam-se em desacordo com o padrão microbiológico estabelecido pela legislação brasileira, conforme demonstra a Tabela 1 a seguir. As amostras classificadas como impróprias apresentaram valores acima de 10^2 NMP de coliformes termotolerantes por grama de hortaliça, conforme estabelecido pela ANVISA.

Tabela 1 Padrão microbiológico das amostras em relação à presença de Coliformes Termotolerantes, segundo a ANVISA.

N. da amostra	Alimento (MP)	Valores Obtidos (NMP/g)	Resultado
1	Acelga	$9,3 \times 10^1$	Próprio
2	Acelga	$4,6 \times 10^2$	Impróprio

N. da amostra	Alimento (MP)	Valores Obtidos (NMP/g)	Resultado
3	Acelga	< 3	Próprio
4	Acelga	4	Próprio
5	Alface	2,1 x 10 ²	Impróprio
6	Alface	< 3	Próprio
7	Alface	2,3 x 10 ¹	Próprio
8	Alface	≥ 2,4 x 10 ³	Impróprio
9	Cenoura	1,1 x 10 ³	Impróprio
10	Cenoura	≥ 2,4 x 10 ³	Impróprio
11	Cenoura	9,3 x 10 ¹	Próprio
12	Cenoura	4,6 x 10 ²	Impróprio
13	Couve	4	Próprio
14	Couve	≥ 2,4 x 10 ³	Impróprio
15	Couve	2,0 x 10 ¹	Próprio
16	Couve	9,3 x 10 ¹	Próprio
17	Repolho	< 3	Próprio
18	Repolho	< 3	Próprio
19	Repolho	< 3	Próprio
20	Repolho	< 3	Próprio

Tem-se, portanto, que as cenouras minimamente processadas foram as amostras com maior índice de contaminação fecal. Em comparação ao número total de amostras impróprias (35%), as cenouras obtiveram índice de contaminação fecal igual a 42,8% em relação aos outros grupos, que obtiveram os seguintes resultados: acelga (14,2%), alface (28,6%), couve (14,2%) e repolho (0%).

Os grupos correspondentes à acelga, à alface, à couve e à cenoura minimamente processadas apresentaram pelo menos uma amostra com índice de Coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação; entretanto, todas as amostras de repolho estiveram dentro do estabelecido pela legislação vigente, conforme aponta a Figura 1 a seguir.

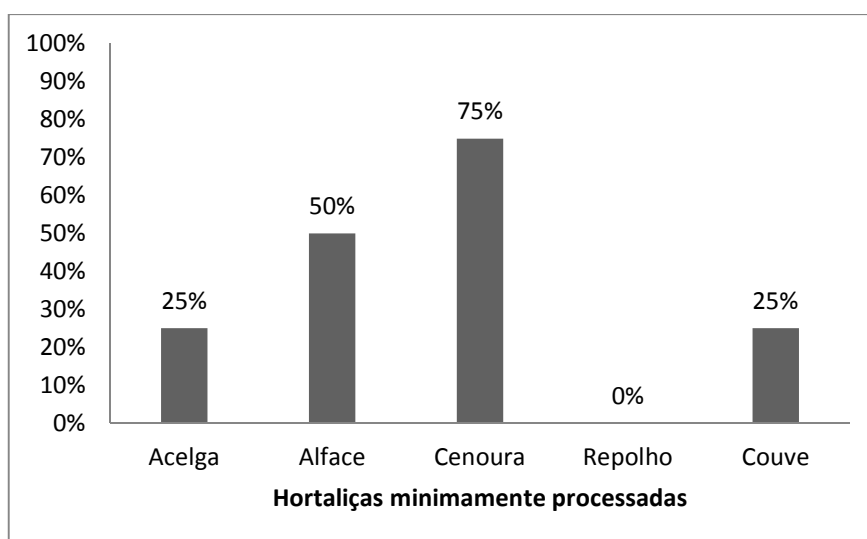


Figura 1 Porcentagem de amostras impróprias para consumo humano por classe de alimento, segundo a ANVISA.

Nenhum dos cinco grupos de alimentos estudados apresentaram-se contaminados com *Salmonella* sp., indicando ausência deste patógeno em todas as amostras.

Na análise de Coliformes totais, 65% (n=13) apresentaram índice maior ou igual a $1,1 \times 10^3$, conforme aponta a Tabela 2, tornando-as inadequadas para o consumo humano, como descrito por Berbari; Paschoalino; Silveira (2001).

Tabela 2 Padrão microbiológico das amostras em relação à presença de Coliformes totais, segundo Berbari; Paschoalino; Silveira (2001).

N. da amostra	Alimento (MP)	Valores Obtidos (NMP/g)	Resultado
1	Acelga	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
2	Acelga	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
3	Acelga	$1,5 \times 10^2$	Seguro
4	Acelga	$1,5 \times 10^2$	Seguro
5	Alface	$1,1 \times 10^3$	Contaminado
6	Alface	$2,4 \times 10^2$	Seguro
7	Alface	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
8	Alface	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
9	Cenoura	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
10	Cenoura	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
11	Cenoura	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
12	Cenoura	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
13	Couve	$1,5 \times 10^2$	Seguro
14	Couve	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
15	Couve	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
16	Couve	$1,1 \times 10^3$	Contaminado
17	Repolho	$1,5 \times 10^2$	Seguro
18	Repolho	$2,4 \times 10^2$	Seguro
19	Repolho	$\geq 2,4 \times 10^3$	Contaminado
20	Repolho	$4,6 \times 10^2$	Seguro

As amostras caracterizadas como contaminadas, segundo Berbari; Paschoalino; Silveira (2001), também apresentaram em sua maioria contaminação de Coliformes totais para o grupo das cenouras minimamente processadas ($p=0,047$). Em comparação ao número total de amostras contaminadas por Coliformes totais, as cenouras obtiveram índice de contaminação igual a 30,8% em relação aos outros grupos, que obtiveram os seguintes resultados: acelga (15,4%), alface (23%), couve (23%) e repolho (7,7%).

Comparando-se a Tabela 2 com a Tabela 1, observa-se que todas as amostras (100%) classificadas como impróprias para consumo de acordo com a ANVISA por conterem coliformes fecais foram também classificadas como contaminadas segundo os critérios descritos por

Berbari; Paschoalino; Silveira (2001) para Coliformes totais.

DISCUSSÃO

Segundo as estatísticas brasileiras, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar no Brasil seja bastante elevada. De 1999 até 2008, 6.062 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos foram registrados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, com acometimento de 117.330 pessoas e com 64 óbitos (SVS, 1992).

Apesar de não existirem padrões microbiológicos específicos estabelecidos pela ANVISA para produtos minimamente processados, este trabalho utilizou os padrões para “hortaliças frescas, refrigeradas, cortadas ou congeladas, para

o consumo direto”, de acordo com a RDC, n. 12, de 2 de janeiro de 2001.

Embora as amostras não tenham demonstrado índice algum de contaminação para *Salmonella* sp., sua ocorrência em hortaliças minimamente processadas pode ser atribuída principalmente por contaminação cruzada ocorrida durante o processamento (ARTÉS; GÓMEZ; ARTÉS-HERNÁNDEZ, 2007). Segundo Nguyen-The; Carlin (1994), equipamentos, utensílios, embalagens e manipuladores no processamento mínimo de vegetais são fontes potenciais de contaminação para este patógeno.

Na observação das amostras com resultados acima do permitido pela legislação para coliformes termotolerantes, fica estabelecido que tais alimentos são considerados impróprios para consumo humano, pois indicam contato direto ou indireto com fezes (BRASIL, 2001). Cabrini et al. (2002), ao analisarem hortaliças minimamente processadas, também encontraram em algumas amostras (16,6%) índices de coliformes termotolerantes acima dos limites permitidos para hortaliças. Este trabalho encontrou 35% de coliformes fecais, um número muito mais elevado do que os obtidos por Cabrini et al. (2002). Esse resultado oferece uma indicação de que a frequência de coliformes fecais em hortaliças minimamente processadas da região de Araras-SP é alta.

Pesquisas realizadas em anos anteriores com os mesmos tipos de alimentos comercializados na cidade de Araras também detectaram amostras em desacordo com a legislação vigente (ZANCO, 2005).

Neste estudo, foram encontrados 13 amostras (65%) com contagem elevada de Coliformes totais. Atualmente, preconiza-se que alimentos com altas contagens de Coliformes totais possam ser impróprios para o consumo humano em função da perda do valor nutricional, das alterações organolépticas e dos riscos de contaminação por patógenos (ALVES et al., 2010). Segundo Berbari; Paschoalino; Silveira (2001), é considerada elevada a contagem de Coliformes totais quando superior a $1,1 \times 10^3$ NMP, podendo estes alimentos representar riscos para o consumidor.

Para prevenir os riscos de contaminação, deve-se implantar o programa de Boas Práticas de Fabricação, estabelecido pela Portaria n. 326, de 30

de julho de 1997 da ANVISA (BRASIL, 1997), que é um regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias, e a RDC n. 275, de 21 de outubro de 2002 da ANVISA, que preconiza os Procedimentos Operacionais Padrão e tem como objetivo a avaliação de todas as etapas envolvidas na produção de um alimento, desde a obtenção das matérias-primas até o seu consumo (BRASIL, 2002).

CONCLUSÃO

Verificou-se que 35% das hortaliças minimamente processadas estudadas estavam em desacordo com a RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001, por apresentarem micro-organismos indicadores de contaminação fecal, bem como micro-organismos potencialmente patogênicos. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que há a necessidade de maior controle de qualidade desde o cultivo das hortaliças até o consumo, de forma a garantir produtos saudáveis e seguros para o consumidor, enquadrando-os nos padrões microbiológicos vigentes no país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, J. A. et al. Qualidade de produto minimamente processado à base de abóbora, cenoura, chuchu e mandioquinha-salsa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 625-634, 2010.
- ARTÉS, F.; GÓMEZ, P. A.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. Physical, physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. **Food Science and Technology International**, Cartagena, v. 13, n. 3, p. 177-188, 2007.
- BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 197-201, 2001.

BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on row fruits and vegetables. **Microbes and Infection**, Georgia, v. 4, n. 4, p. 413-423, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS). Portaria n. 326 de 30 de julho de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1º ago. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC 12 de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC n. 275 de 21 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 nov. 2002.

CABRINI, K. T. et al. Pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Limeira, São Paulo. **Higiene Alimentar**, Limeira, v. 16, n. 95, p. 92-94, 2002.

CHINNICI, G.; D'AMICO, M.; PECORINO, B. A multivariate statistical analysis on the consumers of organic products. **British Food Journal**, Catania, v. 104, Iss. 3/4/5, p. 187-199, 2002.

CRUZ, A. G.; CENCI, S. A.; MAIA, M. C. A. Pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma linha de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 104-109, 2006.

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 1992

GOPAL, A. et al. Application of non-conventional disinfection techniques to extend the shelf-life of minimally processed foods. In: World Congress of Food Science and Technology, 10., Sydney. **Anais...** Sydney: Abstract Book, 1999.

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

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. São Paulo: Manole, 2006.

OLIVEIRA, A. M. C. **Estudo das características físico-químicas e microbiológicas de abacaxi (*Ananascomosus*), goiaba (*Psidiumguajava L.*) e maracujá (*P. edulis L.*) minimamente processados**. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

PACHECO, M. et al. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba - SP. **Higiene Alimentar**, Sorocaba, v. 16, n. 101, p. 50-55, 2002.

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

ZANCO, M. **Avaliação Higiênico-sanitária de frutas, hortaliças e vegetais minimamente processadas**. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro Universitário Hermínio Ometto, 2005.