

VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS NA CIDADE DE BOTUCATU: QUALIDADE HIGIENICOSSANTÁRIA E PESQUISA DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA.

Manuela de Moraes Albuquerque ✉
Renata Bossolani Ferreira dos Santos
Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências. UNESP Botucatu, SP.

✉ manuela_albuquerque@hotmail.com

RESUMO

Os produtos minimamente processados são frutas, legumes ou hortaliças ou qualquer combinação destes que tenham sido alterados fisicamente, embora mantenham o seu estado fresco. Estes vegetais surgiram como uma alternativa para o consumidor na busca por produtos de boa qualidade, saudáveis e de fácil preparo e consumo, porém sua qualidade e segurança podem ser afetadas quando micro-organismos patogênicos passam a fazer parte da microbiota em decorrência do manuseio a que são submetidos. Assim, foram analisadas 70 amostras de produtos minimamente processados (legumes, verduras e frutas) de supermercados e quitandas da cidade de Botucatu - SP. Foi realizada a determinação do número mais provável

de coliformes termotolerantes (CT) e a pesquisa de *Salmonella*, conforme recomendação da ANVISA (RDC nº12, 2001). Também foi pesquisada a enumeração de *Staphylococcus aureus*, devido à manipulação intensa da matéria-prima e a pesquisa da produção de enterotoxinas por essas cepas. Dentre as amostras analisadas, todas foram negativas para a presença de *Salmonella*. Nas análises de coliformes termotolerantes, 64,3% apresentaram excesso desse indicador, considerando-se a legislação vigente, que permite até 5×10^2 NMP/g. Em relação ao *Staphylococcus aureus*, em somente uma amostra (2%) foi confirmada a presença desse micro-organismo, sem a produção das enterotoxinas clássicas. Portanto, a presença desses micro-organismos indica

que a qualidade destes produtos não está adequada, podendo trazer riscos à saúde dos consumidores.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. *Salmonella*. Coliformes termotolerantes. Enterotoxinas estafilocócicas. Alimentos prontos para o consumo.

ABSTRACT

Minimally processed products are fruits, vegetables or any combination of these that have been physically altered but remaining fresh. These vegetables are an alternative for consumers looking for good quality products, healthy and easy preparation and consumption. However their quality and safety can

be affected when pathogenic microorganisms become part of microbiota due to handling. Thus there were analyzed 70 samples of minimally processed products (vegetables and fruits) in supermarkets and groceries stores in the city of Botucatu – SP. Was done the determination of the most probable number of thermotolerant coliform (TC) and tested the presence of *Salmonella*s, as recommended by ANVISA (RDC nº12, 2001). *Staphylococcus aureus* and its enterotoxins were researched due to intense manipulation. Among the samples analyzed, all were negative for the presence of *Salmonella*. In the thermotolerant coliforms analysis, 64.3% were above the acceptable limit up to 5×10^2 MPN/g. Regarding *Staphylococcus aureus*, only one sample (2%) was confirmed the presence of this microorganism, without production of classical enterotoxins. Therefore, the presence of these microorganisms indicates that the quality of these products is not appropriate, which may cause risks to consumer health.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. *Salmonella*. Thermotolerant coliforms. Staphylococcal enterotoxins. Ready to eat food.

INTRODUÇÃO

Os vegetais prontos para o consumo surgiram como uma interessante alternativa para o consumidor que procura por produtos de boa qualidade, saudáveis e de fácil preparo e consumo. Em vários países, verificou-se que esses produtos estão sendo oferecidos nos formatos mais variados, sempre visando à agregação de valor e comodidade do consumidor (CANDEL, 2001; MORETTI, 2004). O aumento do

consumo de frutas, legumes e hortaliças, tanto frescos como parcialmente processados, está associado à busca por conveniência na vida atual o que conduziu à produção de amplo número de produtos, que são oferecidos para consumo imediato (BEUCHAT, 2002).

Os produtos minimamente processados são definidos como frutas, legumes ou hortaliças ou qualquer combinação destas que tenham sido alteradas fisicamente, embora mantenham o seu estado fresco. Independentemente do alimento utilizado, este foi selecionado, sanitizado, descascado, cortado e embalado, resultando num produto 100% aproveitável, a fim de oferecer aos consumidores frescor, conveniência e qualidade nutricional (ALVES et al., 2010).

Apesar de todo o crescimento verificado no setor nos últimos anos, é crescente o relato de doenças infecciosas associadas ao consumo de alimentos minimamente processados, o que tem despertado o interesse de agências regulatórias, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), e institutos de defesa dos direitos dos consumidores, como o IDEC (Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor) (ANDRADE et al., 2004).

Muitos micro-organismos podem afetar a qualidade e a segurança desses produtos, considerando que patógenos que, normalmente, não estariam presentes podem passar a fazer parte da microbiota contaminante decorrentes do manuseio a que são submetidos (ROSA & CARVALHO, 2000). A atividade microbiana em minimamente processados pode ser influenciada pelo metabolismo do vegetal, pela atmosfera modificada, embalagem utilizada e temperatura de estocagem (FANTUZZI et al., 2004).

Entre os patógenos isolados em produtos minimamente processados podem ser citados: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, *Bacillus scereus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophyla* (SILVA e GUERRA, 2003; VIEITES et al., 2004).

No Brasil, nos anos de 1996 e de 1998 a 2000, foram registrados 192 surtos de infecção alimentar com 12.188 enfermos e 3 mortes, tendo sido a *Salmonella* sp a responsável pela maioria, com incidência em 76,56% destas ocorrências. As hortaliças de folhas e raízes foram responsáveis por 19 (9,9%) surtos (SIRVETA, 2002).

A Resolução RDC Nº12, de 2 de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, não existindo padrões específicos para os frutos minimamente processados. Estes podem ser inseridos no grupo de alimentos designados como: “frutas frescas, *in natura*, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas), sanitizadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto”, cuja tolerância máxima para amostra indicativa é de 5×10^2 NMP/g de coliformes a 45°C e ausência de *Salmonella* sp em 25g (PINHEIRO et al., 2005).

Dessa forma, avaliamos as condições higienicossanitárias de produtos prontos para o consumo, pela determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes (CT) e a pesquisa de *Salmonella*, conforme recomendação da ANVISA (RDC nº12, 2001). Também foi pesquisada a presença de *Staphylococcus aureus*, devido à manipulação intensa da matéria-prima e à possível produção de enterotoxinas clássicas pelas cepas isoladas, uma vez que esses alimentos raramente são comercializados na temperatura adequada, além do período entre a aquisição no supermercado até a refrigeração caseira.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 70 amostras de produtos minimamente processados (legumes, verduras e frutas) em supermercados e quitandas da cidade de Botucatu – SP. As amostras foram mantidas sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, até o momento do processamento no laboratório. Foram coletadas, preferencialmente, amostras de vegetais consumidos crus, como alface, rúcula, cenoura e beterrabas raladas para saladas e frutas picadas.

Preparo das amostras e suas diluições:

Para a análise, 25 gramas da amostra foram pesados e homogeneizados em 225 mL de água tamponada esterilizada, em sacos plásticos apropriados, que foram levados ao Stomacher Lab Blender 400 por trinta segundos. A partir desta diluição inicial de 10^{-1} , foi preparada uma série de diluições decimais, utilizando-se salina.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes (KORNACKI & JOHNSON, 2001)

Cada diluição da amostra foi inoculada em volumes de 1 mL, em cada série de três tubos por diluição, contendo 10 mL de caldo lauril sulfato com um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C por 24-48 horas. Os inóculos positivos se revelaram pela observação da produção de gás no tubo de Durham. A seguir, três alçadas de cada tubo positivo foram repicadas em tubos de ensaio com 5 mL de caldo EC para a confirmação de coliformes termotolerantes (CT). Todos os tubos de EC continham tubos de Durham invertidos. O caldo EC foi inoculado a 45°C por 24 horas. Após o período de incubação, a leitura foi realizada pela observação da presença de gás no tubo de Durham invertido. A seguir, utilizando-se a tabela do NMP, foram

calculados os NMP de CT por grama de amostra analisada.

Enumeração de estafilococos coagulase positiva

(LANCETTE & BENNETT, 2001)

Para a enumeração dos estafilococos, foi utilizado o método da semeadura em superfície, onde 0,1 mL das diversas diluições da amostra foram depositados em placas de Petri com ágar Baird-Parker suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo e o inóculo foram espalhados com o auxílio de um bastão de vidro em L. Após a incubação a 35°C por 48 horas, foi realizada a contagem da placa que apresentou entre 25 e 250 UFC (Unidades Formadoras de Colônias). As colônias suspeitas de estafilococos coagulase positiva apresentaram cor negra, com ou sem halo e um máximo de cinco colônias foram isoladas e repicadas para tubos com TSA inclinado, que foram incubados por 24 horas a 35°C. Foram realizados os testes da produção de catalase e coloração pelo método de Gram. Após estes testes iniciais, foi realizado o teste da coagulase em tubo e termonuclease.

Para identificação de *S. aureus*, as cepas positivas nas duas provas anteriores foram submetidas ao kit “Staphylect Test Dry Spot”, onde partículas azuis de látex foram recobertas com fibrinogênio humano e imunoglobulinas tipo G contra a proteína A de *S. aureus*, o Fator Clumping e a cápsula de *S. aureus* metilicina-resistente.

Deteção da presença de Salmonella (ANDREWS et al., 2001)

Para a deteção da presença de *Salmonella*, 25 gramas da amostra do alimento foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada tamponada, em um saco plástico no “Stomacher” durante dois minutos. Após esse período, o homogeneizado foi transferido a um Erlenmeyer e incubado a 35°C por 24 horas. A seguir, 1 mL foi semeado em um tubo de ensaio contendo 10

mL de caldo tetratoato ao qual foi adicionado um volume de 0,2 mL de iodeto de potássio imediatamente antes do uso. O tubo foi incubado a 35°C por 24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo com 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e foi incubado a 42°C por 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e placas contendo ágar *Salmonella-Shigella*. Após incubação de 24 horas a 35°C, as colônias características de *Salmonella* foram isoladas e repicadas para tubos de ensaio contendo ágar tripticase soja (TSA), sendo consideradas as cepas estoque. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. A partir desse crescimento foram feitos repiques em tubos de ensaio contendo ágar tríplice açúcar ferro inclinado (TSI) e em tubos com ágar fenilalanina inclinado. Os tubos foram incubados a 35°C por 18-24 horas. Após os resultados esperados nestes 2 testes, a cepa foi submetida ao sistema API-20E (Biomérieux), que apresenta 20 provas bioquímicas para enterobactérias. Após leitura positiva no API, as cepas foram testadas frente ao soro polivalente somático e depois da positividade deste, ao soro flagelar.

Produção de enterotoxinas clássicas por cepas de S. aureus

As cepas de *S. aureus* foram cultivadas em caldo BHI e incubadas a 37°C/24 horas. A seguir, 0,1 mL destes crescimentos foram transferidos para placas de ágar BHI, acrescido de 1% de extrato de levedura, com um papel celofane esterilizado na sua superfície. Esse volume foi espalhado com o auxílio de uma alça em “L” e essas placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após este período, uma alíquota de 2,5 mL de Na_2HPO_4 0,01M foi adicionada à superfície e, após homogeneização com o crescimento, o volume foi transferido para um *ependorf*, submetido

a uma centrifugação a 10.000 rpm/10 minutos/4°C (ROBBINS et al., 1974). Os sobrenadantes obtidos pelas duas metodologias foram testados frente às toxinas A, B, C e D, pelo método de RPLA, num kit comercial da Oxoid.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação do NMP/g de coliformes termotolerantes mostrou que das 70 amostras analisadas, 45 (64,3%) estavam fora do limite aceitável pela ANVISA (2001), de até 5×10^2 NMP/g. Oliveira et al. (2005) ressaltaram que a presença de coliformes termotolerantes é mais significativa como indicação de contaminação fecal do que a presença de coliformes totais, o que indica condições higienicossanitárias insatisfatórias durante o processamento. Pinheiro et al. (2005), em uma avaliação da qualidade microbiológica dos frutos comercializados em Fortaleza, obtiveram 28% das amostras fora do limite aceitável para coliformes termotolerantes. Números mais altos foram encontrados por Fröderet al. (2007), onde 73% das amostras de vegetais minimamente processados na cidade de São Paulo estavam fora dos padrões, indicando condições higienicossanitárias deficientes.

Salmonella não foi observada em nenhuma das amostras analisadas. Resultados semelhantes foram observados por Aguila et al. (2006), que analisando a microbiota de rabanetes minimamente processados, também não constataram a presença de *Salmonella* em nenhuma das amostras. Sasaki et al. (2006) obtiveram o mesmo resultado, verificando ausência desse micro-organismo em todas as amostras avaliadas de abóbora. Já Fröder et al. (2007), em São Paulo, observaram 3% das amostras contaminadas com *Salmonella*.

Staphylococcus aureus é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação

alimentar (STAMFORD et al., 2006). Esta bactéria habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode facilmente contaminar as mãos do homem e, a seguir, os alimentos, causando a intoxicação alimentar estafilocócica, se ocorrem condições adequadas de tempo e temperatura (MURRAY et al., 2000). A presença desta bactéria foi confirmada em uma das amostras (2%), em baixa concentração, de somente 10^2 UFC/g. Essa única cepa não produziu nenhuma das enterotoxinas clássicas (A,B,C,D). Resultados semelhantes foram verificados por Damasceno et al. (2005), que não encontraram esse micro-organismo em 21 amostras de melão minimamente processado e por Almualla et al. (2010), que pesquisaram 120 amostras entre tabule, salada grega, salada de repolho e homus. Ferreira et al. (2003) encontraram valores maiores e confirmaram a presença dessa bactéria em 15% das 20 amostras de legumes e verduras minimamente processados e congelados obtidos no comércio varejista da cidade de São Luís – MA.

CONCLUSÃO

O fornecimento de um alimento seguro ao consumidor envolve o esclarecimento e a manipulação adequados, mas a presença de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus aureus* nas amostras analisadas demonstraram que a qualidade higienicossanitária destes vegetais minimamente processados não estava adequada, podendo trazer riscos à saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

AGUILA, J. S. D.; SASAKI, F. F.; HEIFFIG, L. S.; ONGARELLI, M. G.; GALLO, C. R. Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 75 - 78, 2006.

ALMUALLA, N.A., et al. Aspects of the Microbiological Quality and Safety of Ready-to-Eat

Foods in Sharjah Supermarkets in the United Arab Emirates. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 7, p. 1328–1331, 2010.

ALVES, J.A., et al. Vida útil de produto minimamente processado composto por abóbora, cenoura, chuchu e mandioquinha-salsa. **Ciênc. Agrotec.**, v. 34, n. 1, p. 182-189, 2010.

ANDRADE, N.; BASTOS, M. S. R.; ANTUNES, M. A. Higiene e sanitização de frutas e hortaliças minimamente processadas. In: MORETTI, C. L. (Ed.). **Processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, J.S.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **American Public Health Association**. Washington, 4th edition, p.357-380, 2001.

BEUCHAT, L. R. Ecological factor influencing survival and growth of humans pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infections**, v. 4, p. 413-423, 2002.

CANDEL, M. J. J. M. Consumers' convenience orientation towards meal preparation: conceptualization and measurement. **Appetite**, v. 36, p. 15-28, 2001.

DAMASCENO, K.S.F.S.C., et al. Melão Minimamente Processado: Um controle de qualidade. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 4, p. 651-658, 2005.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 2, p. 207–211, 2004.

FERREIRA, M.G.A.B.; BAYMA, A.B.; MARTINS, A.G.L.A.; GARCÍAS JÚNIOR, A.V.; MARINHO, S.C. Aspectos higiênicosanitários de legumes e verduras minimamente processados e congelados. **Rev. Hig. Alimentar**, v.17, n.106, p. 49-55, 2003.

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

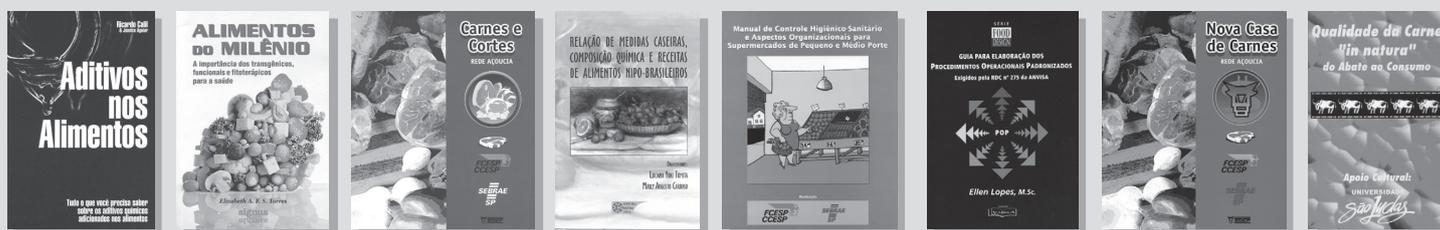
KORNACKI, J.L. & JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. **American Public Health Associa-**

tion, Washington, 4th edition, p.69-82, 2001.
 LANCETTE, G.A. & BENNETT, R.W. **Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins**. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. American Public Health Association Washington, 4th edition, p. 387-403, 2001.
 MORETTI, C. L. Panorama do processamento mínimo de hortaliças. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2004, Viçosa, MG. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2004. p. 1-8.
 MURRAY, K., et al. Use of ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O 157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. **International Journal of Food Microbiology.**, v. 57, p.147-158, 2000.
 OLIVEIRA, A. M. C.; PINTO, G. A. S.; BRUNO, L. M.; AZEVEDO, E. H. F. Avaliação da qualidade higiênicossanitária de alface minimamente

processada, comercializada em Fortaleza, CE. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 19, n. 135, p. 80 - 85, 2005.
 PINHEIRO, N.M.S., et al. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Rev. Bras. Frutic**, v. 27, n. 1, p. 153 - 156, 2005.
 ROBBINS, R.; GOULD, S., BERGDOLL, M., Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Microbiol.**, v.28, p. 946-50, 1974.
 ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P. de. Características microbiológicas de frutos e hortaliças minimamente processados. **Boletim SBCTA**, v. 34, n. 2, p. 84-92, 2000.
 SASAKI, F. F.; AGUILA, J. S. D.; GALLO, C. R.; ORTEGA, E. M. M.; JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. Alterações fisiológicas, qualitativas e microbiológicas durante o armazenamento de abóbora minimamente processada em diferentes tipos de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 170 - 174, 2006.

SILVA, M.Z.T.; GUERRA, N.B. Avaliação das condições de frutos minimamente processados. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 29-36, 2003.
 SIRVETA - SISTEMA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE ENFERMIDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS. Sistema de informação regional para a vigilância epidemiológica de enfermidades transmitidas por alimentos. Módulo dinâmico de acesso a informação. Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/sirveta/e/index>>. Acesso em: 25 de set. 2002.
 STAMFORD, T. L. M. Enterotoxigenidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.1, p. 41-45, 2006.
 VIEITES, R.L.; EVANGELISTA, R.M.; CAMPOS, A.J.; MOREIRA, G.C. Avaliação da contaminação microbiana do mamão minimamente processado e irradiado. **Rev. Hig. Alimentar**, v 18, n. 118, p. 65-70, 2004. ❖

Material para Atualização Profissional



Vive-se uma época de rápidas transformações tecnológicas, na qual a qualidade é componente vital. E o treinamento é fator decisivo para se alcançar qualidade. HIGIENE ALIMENTAR oferece aos seus leitores alguns instrumentos para auxiliarem os profissionais nos treinamentos.

CONSULTE-NOS

Pedidos à Redação

Rua das Gardêneas, 36 – 04047-010 – São Paulo - SP – Tel.: (011) 5589-5732

Fax: (011) 5583-1016 – E-mail: redacao@higienealimentar.com.br

revista
Higiene
Alimentar