

AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES EM HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS COMERCIALIZADAS EM RECIFE – PE

Luciana Leocádio de Almeida SOUZA¹, Lúcia Roberta de Souza FILIZOLA².

¹ Acadêmica do Curso de Nutrição, Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS), Recife – PE, e-mail: lleocadio@hotmail.com

² Tutora do Laboratório de Microbiologia Básica e Bacteriologia da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS), Recife – PE, e-mail: lrfilizola@gmail.com

Resumo

A alimentação saudável e equilibrada é um meio de prevenção de enfermidades e essencial para a promoção da saúde. A ingestão de alimentos inseguros contendo bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas nocivas podem ser fatais. O presente estudo teve como objetivo avaliar e determinar a presença de coliformes totais e termotolerantes em vinte amostras de hortaliças minimamente processadas comercializadas prontas para consumo em unidades de alimentação e nutrição da cidade do Recife. As amostras foram analisadas segundo a metodologia de determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes. Os resultados revelaram que 30% (seis) das amostras apresentaram valores maiores que o limite estabelecido pela legislação para o ensaio de coliformes termotolerantes. Dessa forma, se faz importante a implantação e o persistente monitoramento das boas práticas agrícolas e de fabricação adotadas para minimizar os riscos de contaminação microbiana nesses alimentos, a fim de ofertar alimentos seguros aos seus consumidores.

Palavras-chave: Qualidade de alimentos. Segurança alimentar. Análise microbiológica. *Escherichia coli*. Hortaliças.

Abstract

Healthy and balanced nutrition is a way of disease prevention and essential for health promotion. Intake of unsafe food containing bacteria, viruses, parasites or harmful chemicals can be fatal. The present study aimed to evaluate and determine the presence of total and thermotolerant coliforms in twenty samples of minimally processed vegetables commercialized ready for consumption in food services of the city of Recife. The samples were analyzed according to the methodology of determination of the Most Likely Number of

total and thermotolerant coliforms. The results showed that 30% (six) of the samples presented values higher than the limit established by the legislation for the test of thermotolerant coliforms. Therefore, the implantation and the persistent monitoring of good agricultural and manufacturing practices adopted to minimize the risks of microbial contamination in these foods is important, in order to offer safe food to its consumers.

Keywords: *Food quality. Food safety. Microbial evaluation. Escherichia coli. Vegetables.*

Introdução

O Sistema Nacional de Segurança Alimentar foi criado em 2006 com o objetivo de assegurar o direito humano à alimentação adequada. Os legumes e verduras são alimentos excepcionalmente saudáveis. São excelentes fontes de fibras, de vitaminas e minerais e de vários compostos bioativos que contribuem para a prevenção de várias doenças. São alimentos que possuem alta densidade de nutrientes e baixas concentrações de calorias, características que os tornam ideais para a prevenção do consumo excessivo de energia e da obesidade e das doenças crônicas associadas a esta condição, como as doenças do coração e o diabetes (BRASIL, 2014).

O acesso a alimentos nutritivos e seguros é fundamental para sustentar e promover boa saúde. A ingestão de alimentos inseguros contendo bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas nocivas, causa mais de 200 doenças - desde diarreia a alguns tipos de câncer. A

segurança alimentar e nutricional abrange, além de outros aspectos, a garantia da qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica dos alimentos (BRASIL, 2006).

Estima-se que 600 milhões - quase 1 em cada 10 pessoas no mundo - adoçam depois de comer alimentos contaminados e 420.000 morrem todos os anos (WHO, 2017), portanto, a garantia da qualidade microbiológica dos alimentos é essencial para evitar casos de intoxicação alimentar, por vezes fatais.

A contaminação de um alimento pode ocorrer em qualquer uma das várias etapas da cadeia de produção. Um dos tipos de contaminação dos alimentos pode ser a contaminação biológica que ocorre quando microrganismos indesejáveis, como bactérias, fungos, vírus ou parasitas, estão presentes no alimento (ANVISA, 2009). Ela pode se originar diretamente ou indiretamente do ambiente (água, vento, solo, animais ou equipamentos) ou de

humano durante o cultivo, colheita ou processamento. Os patógenos humanos geralmente não fazem parte da microbiota normal das hortaliças e indicam fontes de contaminação humana ou animal no ambiente de produção primária (ICMSF, 2015).

Há várias décadas vem crescendo a preocupação da contaminação dos alimentos por microrganismos. Por ser considerado um excelente meio de cultura, o alimento permite a proliferação de microrganismos, e através destes podemos avaliar o grau e a procedência da contaminação. Tem-se, portanto, tornado rotineira a prática de analisar nos alimentos a existência de possíveis bactérias produtoras de toxinfecções alimentares. Estas bactérias são denominadas microrganismos indicadores de contaminação, que são consideradas de grande significância quando da avaliação da segurança e qualidade microbiológica dos alimentos frente aos padrões exigidos nas normatizações oficiais (CUNHA, 2006).

O grupo coliforme é considerado forte indicador de má higienização do alimento na avaliação da qualidade higiênico-sanitária de alimentos, quando relacionado com as etapas de processamento e manipulação (SOUZA, 2007).

Coliformes termotolerantes são subgrupos dos coliformes totais, fermentadores de lactose e produtores de gás em temperaturas de 44 a 45,5 °C, este grupo envolve pelo menos três gêneros, que são *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (LIMA, 2012).

A espécie bacteriana denominada *Escherichia coli*, bastonete gram-negativo, pertence à família *Enterobacteriaceae*. Sua presença nos alimentos em quantidades elevadas indica a possibilidade de contaminação fecal e a presença de outros microrganismos enteropatogênicos. Embora a maioria das cepas de *E. coli* não sejam consideradas patogênicas, elas podem ser consideradas patógenos oportunistas que causam infecções em hospedeiros imunocomprometidos (FENG et al., 2001). A presença de *E. coli* patogênica em alimentos caracteriza perigo em potencial para a saúde coletiva, em razão de sua capacidade de ocasionar surtos de enfermidades transmitidas por alimentos e até mesmo levar o consumidor a óbito, dependendo do sorogrupo envolvido (SÃO JOSÉ; FARIA SILVA, 2014).

Visando a proteção à saúde da população, a Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para

alimentos e estabelece a tolerância de até 10^2 NMP/g para coliformes termotolerantes em pratos prontos para consumo.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar e determinar a presença de coliformes totais e termotolerantes em amostras de hortaliças minimamente processadas comercializadas prontas para consumo ofertadas em serviços de alimentação da cidade do Recife, estabelecendo assim um perfil das condições higiênico-sanitárias dos produtos comercializados frente ao padrão de qualidade microbiológico estabelecido por lei.

Material e Métodos

Foram coletadas 20 amostras de hortaliças, simulando o consumidor e acondicionadas em caixa isotérmica, quando necessário, para serem transportadas sob temperatura ambiente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade Pernambucana de Saúde. Das 20 amostras deste estudo, 6 amostras se encontravam embaladas, higienizadas e expostas para venda, prontas para consumo e 14 amostras foram coletadas nas mesas de *buffet* de treze estabelecimentos com serviço de *self-service* localizados em shopping centers, padarias, *delicatessen* e supermercados.

As análises microbiológicas das 20 amostras foram iniciadas em tempo inferior a duas horas após a coleta.

A metodologia utilizada foi pela determinação de Número Mais Provável (NMP) preconizada pelo *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (SALFINGER; TORTORELLO, 2001). Para o teste presuntivo 25g de cada amostra foram pesadas asépticamente e homogeneizadas em 225 mL de Caldo Lactosado (CL) a 0,1% e homogeneizado. Alíquotas de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL de cada amostra em CL foram inoculadas em três séries de três tubos contendo 9mL de Caldo Lauril Sulfato Triptona (LST), com tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados à $35^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}/24\text{--}48\text{h}$. Os testes confirmativos para coliformes totais e coliformes termotolerantes foram realizados nos tubos com leitura positiva (presença de gás). Para cada tubo LST positivo, foram transferidas três alças de inoculação em tubo com Caldo Bile Verde Brilhante, em triplicata, e incubados a $35^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}/24\text{--}48\text{h}$ e em tubo com Caldo *Escherichia coli*, em triplicata e incubados por $24\pm 2\text{h}$ a $44,5^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Foram considerados positivos os tubos com turvação e produção de gás no tubo de ensaio com Durham. Os resultados de cada amostra analisada foram expressos em Número Mais Provável (NMP/g) e

comparados com a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

Resultados e Discussão

O resultado da análise de coliformes totais e termotolerantes está apresentado na Tabela 1.

A *Escherichia coli* é usada como indicador de contaminação fecal recente ou

processamento pouco higiênico (FENG et al., 2001). Não existe na legislação brasileira informações quanto aos limites de contagens toleradas para coliformes totais.

Tabela 1: Resultado do teste confirmativo para coliformes totais e termotolerantes

NMP/g	Coliformes Totais Amostras (%)	Coliformes Termotolerantes Amostras (%)
< 3	0 (0)	10 (50)
<3 – 99	0 (0)	04 (20)
100-1100	2 (10)	03 (15)
> 1100	18 (90)	03 (15)
TOTAL	20 (100)	20 (100)

A RDC 12/01 da ANVISA em seu item 22 para “Pratos Prontos para o Consumo” (alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares) – item d) saladas mistas, temperadas ou não, com ou sem molho e a base de verduras e legumes crus, temperados ou não, em molho ou não - estabelece os coliformes termotolerantes como microrganismo indicador de contaminação fecal, para amostras indicativas com limite de tolerância de 100 NMP/g.

Conforme Tabela 1, das 20 amostras analisadas, 30% (seis) das

amostras apresentaram valores maiores que o limite estabelecido pela legislação para o ensaio de coliformes termotolerantes, ou seja, 30% das amostras estavam impróprias para o consumo humano e 70% das amostras estavam de acordo com os padrões legais vigentes.

Das amostras consideradas insatisfatórias quanto as condições higiênico-sanitárias e impróprias para consumo, a amostra 2 era coentro higienizado vendido pronto para consumo, a amostra 7 era alface crespa vendida em um restaurante *self-service*, a amostra 9 era

uma salada crua de repolho com pimentões coloridos vendido em uma *delicatessen*, a amostra 10 era salada crua de rúcula, tomate cereja e cebola vendida em uma padaria, a amostra 16 era salada crua de alface crespa, cebola e cenoura vendida em um restaurante e amostra 18 era repolho branco vendida em um restaurante de um shopping center da cidade do Recife.

Em relação a contagem de coliformes totais, 90% das amostras apresentaram contagem acima de 10^3 NMP/g. Ao avaliar a qualidade microbiológica de hortaliças processadas comercializadas em Fortaleza – CE, BRUNO et al. (2005) constataram em relação a contagem de coliformes totais, que 53,3% das amostras de hortaliças/tubérculos analisadas apresentaram resultados superiores a 10^3 NMP/g, enquanto que se verificou que 13,3% das amostras de hortaliças/tubérculos apresentaram contagem de coliformes fecais acima do padrão recomendado pela legislação vigente.

PALÚ et al. (2002) ao analisarem hortaliças frescas servidas em restaurantes *self-service* privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro, encontraram que 92,3% das amostras de hortaliças analisadas estavam com contagem de coliformes termotolerantes acima do padrão preconizado pela legislação.

JUNIOR et al. (2012) avaliando amostras de alface de 10 restaurantes localizados na cidade de Gurupi – TO, detectaram que do total de amostras analisadas, 68,42% apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação, evidenciando que a qualidade destas amostras esteve próxima a de um produto sem tratamento, oferecendo risco potencial ao consumidor quanto à presença de patógenos entéricos.

PAULA et al. (2003) analisaram 30 amostras de alfices de restaurantes *self-service* de Niterói – RJ, detectaram contagem de coliformes fecais acima do padrão preconizado pela legislação em 53,3% das amostras.

A legislação sanitária federal regulamenta um conjunto de medidas que devem ser adotadas pelos serviços de alimentação a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos alimentos com os regulamentos técnicos, chamadas de Boas Práticas de Fabricação (BPF). A partir da análise desse estudo e dos dados encontrados na literatura, observa-se que muitos estabelecimentos não estão em conformidade com as BPF, revelando a ausência de boas práticas de manipulação para saladas cruas servidas em restaurantes e mercados, fato este que se constitui um risco à saúde do consumidor.

Conclusão

O processo de produção dos derivados de hortaliças passa por diversas etapas, como manejo, pós-colheita, seleção, lavagem, sanitização, corte, enxágue, descascamento, cocção, secagem, embalagem e armazenamento. O resultado, quando adequadamente conduzido de maneira a se priorizar a qualidade, é um produto sem microrganismos patogênicos ao ser humano e com ótimos atributos e que preserve as características nutricionais dos alimentos.

No presente estudo, encontramos estabelecimentos que ofertam produtos com qualidade microbiológica fora dos padrões estabelecidos em legislação, portanto, é importante a implantação e o persistente monitoramento das boas práticas agrícolas e de fabricação adotadas para minimizar os riscos de contaminação microbiana nesses alimentos.

Este estudo também tem relevância no sentido de evidenciar que a avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos consumidos tem um papel importante na verificação da eficácia dos processos de limpeza e desinfecção.

É obrigação dos estabelecimentos produzirem alimentos seguros e é de interesse dos consumidores a ingestão de alimentos seguros, assim se faz necessário maior vigilância dos agentes reguladores.

A intervenção e ampliação das perspectivas educacionais para a manipulação adequada de alimentos, também pode contribuir no fornecimento à população um alimento seguro, do ponto de vista microbiológico.

Referências Bibliográficas

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Alimentos e Vigilância Sanitária. Brasília: [S.I.], 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set. 2006. Seção 1, p. 1. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11346.htm>. Acesso em: 27 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/>. Acesso em: 09 ago. 2017.

BRUNO, L. M. et al. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 75-84, 2005.

CUNHA, M. A. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias, v.1, n.1, p. 09-13, jan/jun. 2006.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Sept. 2002. In: Food and Drug Administration - FDA/CFSAN. Bacteriological Analytical Manual on line. Jan. 2001. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>> Acesso em: 23 de abril de 2018.

FERREIRA, C. C. et al. Análise de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Belo Horizonte- MG. Hu Revista, Juiz de Fora, v. 42, n. 4, p.307-313, nov. 2016.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). **Microrganismos em Alimentos 8 – Utilização de Dados para Avaliação do Controle de Processo e Aceitação de Produto**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2015.

JUNIOR, J. P.; GONTIJO, E. E. L.; SILVA, M. G. Perfil parasitológico e microbiológico de alfaces comercializadas em restaurantes self-service de Gurupi – TO. Revista Científica do ITPAC, v. 5, n. 1, p. 1-8, jan. 2012.

LIMA, C. L. S. Avaliação dos perigos microbiológicos em uma indústria de beneficiamento de pescado e sugestão de um sistema de gestão de qualidade. 2012. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) - Núcleos de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.

PALÚ, Â. P. et al. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, servidas em restaurantes self-service privados, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Higiene Alimentar. São Paulo, v.16, n.100, p. 67-74, set. 2002.

PAULA P., RODRIGUES P. S. S., TÓRTORA J. C. O., Uchôa C.M.A., FARAGE S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca*

sativa) de restaurantes self service, de Niterói, RJ. Rev Soc Brasil MedTrop. 2003; 36(4):535-537.

SALFINGER Y.; TORTORELLO M. L. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of food*. 2. ed. Washington: APHA, 2001.

SÃO JOSÉ, J.; FARIA SILVA, L. Ocorrência de patógenos em frutas e hortaliças. Higiene Alimentar, vol. 28 n. 234/235, p. 99, jul/ago. 2014.

SOUZA, G. C. Detecção de Betalactamases de espectro expandido (ESBL) em cepas de coliformes isoladas de carne de frango comercializadas na cidade de Fortaleza, Ceará. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

WHO. Food safety. Disponível em: <<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em: 09 abr. 2018.

PARA REMESSA DE MATÉRIA TÉCNICA

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, revisões bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do programa*; gráficos em *Winword, Power Point* ou *Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw* nas mais variadas versões do programa (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *Photo Shop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. Do trabalho deverão constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Resultados de pesquisas relacionados a seres humanos deverão ser apresentados acompanhados do número do parecer junto ao Comitê de Ética da instituição de origem ou outro relacionado ao Conselho Nacional de Saúde.

05. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e co-autores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições às quais pertencem,

com três níveis hierárquicos (Universidade, Faculdade, Departamento), também a cidade, estado e país.

06. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.

07. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).

08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados

09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.

10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.

11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e co-autores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.

12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail autores@higienealimentar.com.br.

13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada **declaração de recebimento** ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-mail autores@higienealimentar.com.br

14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via e-mail.

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista. Neste caso, por ocasião da publicação, será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diagramada. Não havendo autor assinante, a taxa de publicação será de R\$ 70,00 por página diagramada.

17. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do *e-mail* autores@higienealimentar.com.br