



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados

Marília Marques Knychala¹; Roberta Torres de Melo^{1,2}; Eliane Pereira Mendonça^{1,2}; Letícia Ríspoli Coelho^{1,2}; Daise Aparecida Rossi^{1,2}

¹ Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada – Universidade Federal de Uberlândia;

² Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Uberlândia.

Resumo

Com o objetivo de verificar a qualidade microbiológica em vegetais que foram minimamente processados, foram coletadas 36 amostras de vegetais folhosos e legumes em três diferentes fases: após o término do processamento na unidade produtora; na entrega do produto na cozinha industrial; e no alimento pronto para consumo no restaurante. As amostras foram submetidas à análise microbiológica por meio da quantificação de coliformes termotolerantes e presença/ausência de *Salmonella* spp. As contagens médias para coliformes termotolerantes em folhosas apresentaram médias de $1,4 \times 10^4$, $8,9 \times 10^3$ e $4,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹, após o término do processamento, na entrega na cozinha industrial e no alimento pronto para consumo, respectivamente, sem diferença significativa entre elas. Em vegetais leguminosos, as contagens médias foram de $2,5 \times 10^3$, $1,6 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ respectivamente, com diferença significativa na última etapa, deixando evidente o risco do consumo. Os

valores encontrados demonstram o alto índice de contaminação por coliformes termotolerantes. Não houve positividade para *Salmonella* spp. tanto em vegetais leguminosos quanto em folhosos, indicando conformidade com a legislação vigente. As elevadas contagens encontradas para coliformes evidenciam que há problemas no manejo sanitário destes vegetais em todos os pontos de coleta, indicando a necessidade de implantação de medidas corretivas e preventivas.

Palavras-chave: Coliformes. *Salmonella*. Segurança alimentar.

Microbiology quality of minimum processed vegetables

Abstract

With the objective to verify the microbiological quality in minimally processed vegetables were collected 36 samples of leafy vegetables and legumes in three different phases: after finishing of processing in the producing unit, delivery of products in industrial kitchen and food ready to eat in the restaurant. The samples were subjected to microbiological analysis through quantification of fecal coliform and presence/absence of *Salmonella* spp. The average scores for fecal coliform in hardwoods averages of 1.4×10^4 , 8.9×10^3 and 4.0×10^4 CFU⁻¹, after finishing the processing, delivery in the industrial kitchen and food ready for consumption, respectively, with no difference significant among them. In leguminous plants, the average scores were $2,5 \times 10^3$, $1,6 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^4$ CFU g⁻¹ respectively, with significant difference in the final stage, leaving a clear risk to consumption. The values found show the high rate of contamination by fecal coliform. There were positive for *Salmonella* spp. both in legumes and in leafy vegetables, indicating compliance with current legislation. The high coliform counts found to show that there are problems in the sanitary management of these plants at all sampling points, indicating the need for implementing corrective and preventive measures.

Keywords: Coliforms. *Salmonella*. Food safety.

INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos de boa qualidade microbiológica, adequadamente processados, armazenados e transportados é imprescindível para a saúde do homem. Para a produção de alimentos seguros é importante o uso de matéria-prima em condições higiênico-sanitárias satisfatórias, caso contrário, o processamento posterior pode não ser suficiente para garantir a qualidade sensorial e/ou sanitária. Alterações microbiológicas em alimentos podem ser causas de doenças ao homem, como infecção e/ou intoxicação, podendo levar até mesmo à morte (EFSA, 2009).

As hortaliças representam um grupo alimentar que merece atenção já que são consumidas, na maioria das vezes, sem cocção ou qualquer tratamento térmico (COSTA et al., 2004). A contaminação microbiana que pode ocorrer antes e depois da colheita, através do solo, ar, rega ou lavagem com água imprópria; por transportes inadequados, agressões mecânicas contra a estrutura do produto ou contaminação cruzada com outros alimentos (EVANGELISTA, 1998). O controle da microbiota contaminante é, portanto, fator determinante na vida-de-prateleira e na segurança de seu consumo (AHVENAINEN, 1996).

Os vegetais minimamente processados constituem ótimo meio de crescimento para bactérias. O manuseio impróprio e os equipamentos não sanitizados contribuem de forma decisiva para elevar a população de microrganismos nas hortaliças, aumentando os riscos de patógenos e deteriorantes nesses alimentos (BOLIN et al., 2007). Adicionalmente, a contaminação cruzada pelo contato ou uso de utensílios em comum com outros alimentos constitui uma forma de veicular microrganismos patogênicos nesses alimentos.

Os microrganismos patogênicos diretamente associados a frutas e hortaliças minimamente processadas são: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Camylobacter*, espécies de vibrios e parasitas (VANETTI, 2004).

O acompanhamento da qualidade microbiológica dos vegetais nas diversas etapas de preparo caracteriza uma ferramenta importante na identificação de pontos críticos a serem controlados. A introdução de medidas que garantam a segurança do processo é de suma importância na eliminação, prevenção ou redução dos perigos até níveis aceitáveis (SILVA JR, 2005).

Objetivou-se com este trabalho monitorar a qualidade microbiológica de saladas cruas elaboradas com vegetais minimamente processados e servidas no restaurante de uma universidade federal mineira, desde sua produção até a montagem do prato.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 36 amostras de vegetais folhosos (alface, couve e acelga) e legumes (cenoura, beterraba) coletadas em seis dias aleatórios. As coletas foram realizadas em três diferentes momentos: logo após o processamento na unidade produtora; na entrega do produto na cozinha industrial; e no alimento pronto para consumo no restaurante.

As análises microbiológicas do material foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia. O processamento das amostras foi feito por meio da quantificação de coliformes termotolerantes e presença/ausência de *Salmonella* sp., conforme padrões estabelecidos na RDC 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (BRASIL, 2002).

No laboratório, foram pesadas assepticamente 25g de cada vegetal e adicionadas a 225mL de água peptonada 0,1%. Para a análise de coliformes, foram preparadas diluições decimais seriadas e processadas em ágar cristal violeta vermelho neutro bile –VRBA (SYNTH®). Após solidificação, as amostras foram incubadas a 35°C por 48 horas. As colônias atípicas e típicas foram contadas e no mínimo cinco colônias submetidas a provas confirmativas. A confirmação consistiu em inoculação em tubos contendo caldo E.C. (DIFCO™), com incubação a 45±0,2°C por 48 horas. A diluição utilizada, número de colônias selecionadas para confirmação e número de colônias confirmadas

foram utilizadas para o cálculo do número de coliformes termotolerantes, que foi expresso como UFC.g⁻¹ (unidade formadora de colônia por grama) (BRASIL, 2002).

O protocolo utilizado para avaliação da presença de *Salmonella* foi o recomendado por Silva (2007). Foram pesadas 25g de cada vegetal e adicionadas a 225mL água peptonada tamponada 0,1%, com incubação a 35°C por 18-24 horas. Após, foram realizados repiques para os meios de enriquecimento seletivos, caldo tetracionato (DIFCO) e selenito-cistina (Acumedia), com incubação a 35°C por 24 horas. Alíquotas destes tubos foram plaqueadas em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (DIFCO TM) e ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (ACUMEDIA ®), com incubação a 35°C por 24 horas. Colônias típicas e atípicas foram confirmadas *Salmonella* spp. por meio de provas bioquímicas e aquelas que apresentaram resultados típicos submetidas a confirmação sorológica com antisoro polivalente "O" (PROBAC do Brasil).

Os resultados foram analisados utilizando o teste de variância ANOVA e o teste de Tukey para comparação de médias. A análise foi feita no software SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens de coliformes termotolerantes dos vegetais minimamente processados (folhosos e leguminosos) podem ser observados nas Tabelas 1 e 2.

A RDC nº 12, de 02/01/2001, da ANVISA estabelece como limite máximo para coliformes termotolerantes (45°C) a contagem de 10² UFC.g⁻¹ para hortaliças e de 10³ UFC.g⁻¹ para raízes e tubérculos frescos, "in natura", preparados, sanificados, refrigerados, ou congelados, para consumo direto, com exceção de cogumelos (BRASIL, 2003). As 18 amostras de hortaliças analisadas apresentaram valores acima do recomendado comprovando um alto índice de contaminação. Já nas amostras de legumes apenas duas apresentaram números aceitáveis pela legislação.

Tabela 1 – Contagem de coliformes termotolerantes (UFC.g⁻¹) em vegetais folhosos utilizados no restaurante de uma universidade federal mineira.

Amostra	LOCAL DE COLETA		
	Unidade produtora (UFC.g ⁻¹)	Chegada na cozinha (UFC.g ⁻¹)	Restaurante (UFC.g ⁻¹)
1	4,8x10 ⁴	1,5x10 ³	5,0x10 ³
2	2,3x10 ⁴	1,4x10 ⁴	2,8x10 ⁴
3	3,7x10 ³	6,5x10 ³	1,2x10 ³
4	3,9x10 ³	2,6x10 ⁴	1,0x10 ⁵
5	5,9x10 ³	2,3x10 ³	1,1x10 ⁵
6	1,0x10 ³	3,3x10 ³	7,7x10 ²
Médias/ Desvio padrão	1,4x10⁴ ± 1,8x10³ ^a	8,9x10³ ± 9,5x10³ ^a	4,0x10⁴ ± 5,1x10⁴ ^a

a – letras iguais na mesma linha indicam diferença não significativa (p>0,05).

Considerando que produtos minimamente processados já deveriam ter sofrido algum tipo de assepsia (como lavagem em água corrente, e/ou sanificação), contagens elevadas de coliformes termotolerantes imediatamente após o beneficiamento podem indicar processamento em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Adicionalmente, podem diminuir a vida de prateleira desses alimentos e representar riscos para o consumidor, pois se trata de grupo de microrganismos indicadores de contaminação fecal (BERBARI et al., 2001).

As contagens médias de coliformes termotolerantes nos vegetais folhosos, determinadas nos diferentes pontos de coleta (Tabela 1) não foram significativamente diferentes (p>0,05). Estas contagens elevadas evidenciam problemas no manejo sanitário e no preparo na cozinha industrial, caracterizados como insuficiente na eliminação desses microrganismos. Este problema pode estar relacionado a procedimentos incorretos de higienização

dos vegetais folhosos, os quais devem ocorrer em duas etapas: lavagem em água corrente folha-a-folha ou um-a-um e sanificação, que geralmente é realizada em solução de hipoclorito 100 a 200 p.p.m., onde os vegetais devem ficar imersos por pelo menos 15 minutos (SILVA JR, 2005).

Tabela 2 – Contagem de coliformes termotolerantes (UFC.g⁻¹) em legumes utilizados no restaurante de uma universidade federal mineira.

Amostra	LOCAL DE COLETA		
	Unidade produtora (UFC.g ⁻¹)	Chegada na cozinha (UFC.g ⁻¹)	Restaurante (UFC.g ⁻¹)
1	3,7x10 ²	1,9x10 ³	1,3x10 ⁴
2	6,2x10 ³	1,8x10 ³	6,0x10 ²
3	2,6x10 ³	1,2x10 ³	1,2x10 ⁴
4	1,5x10 ³	3,5x10 ³	2,0x10 ⁴
5	1,0x10 ³	1,3x10 ³	5,4x10 ³
6	3,5x10 ³	2,0x10 ³	3,0x10 ⁴
Médias/ Desvio padrão	2,5x10³ ± 2,1x10³ ^a	1,6x10³ ± 1,1x10³ ^a	1,3x10⁴ ± 1,0x10⁴ ^b

a,b – letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05).

Já a contagem feita nos legumes mostrou diferença significativa nos resultados encontrados na unidade produtora e na entrega na cozinha em relação ao restaurante, onde já estavam prontos para consumo, evidenciando uma possível proliferação microbiana em função das condições de tempo e temperatura no armazenamento.

O percentual de amostras que não atendem aos padrões estabelecidos na legislação brasileira observados neste estudo foi superior ao observado em hortaliças comercializadas no município de São Paulo onde os autores

constataram que *Escherichia coli* estava presente em 74,4% das amostras analisadas (GELLI et al., 1979).

Estudo conduzido por Sagoo et al. (2003) demonstrou que bactérias da família *Enterobacteriaceae* estavam presentes em 2950 vegetais pré-abertos prontos para o consumo. Os autores determinaram contagens inadequadas em 55,5% (1638) amostras.

Todas as amostras analisadas (100%), tanto nos vegetais leguminosos quanto nos folhosos, e em todos os locais coletados foram negativas para *Salmonella* sp., indicando conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2003). Neste estudo, o aumento no número de indicadores fecais não representou um fator de risco para a presença de *Salmonella* sp. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Gelli et al. (1979) e Sagoo et al. (2003), que apesar de determinarem altos números de bioindicadores fecais em hortaliças e vegetais prontos para o consumo, também não detectaram a presença de *Salmonella*.

Segundo Helson (1997) os alimentos considerados mais importantes na transmissão de *Salmonella* a humanos são os de origem animal, com destaque para as aves e produtos à base de aves e ovos. No caso da contaminação de vegetais, a principal fonte de contaminação para *Salmonella* é o emprego de água contaminada, esterco como fertilizante ou por contaminação cruzada com outros alimentos (BEUCHAT, 1996). Considerando que a unidade produtora do vegetal utiliza água tratada na desinfecção dos vegetais analisados, e não faz uso de adubo orgânico, e que, a manipulação na cozinha industrial é realizada dentro das Boas Práticas de Fabricação, este resultado era esperado.

CONCLUSÃO

Os alimentos não apresentaram contaminação por *Salmonella* sp. e todos os pontos da coleta (unidade produtora, chegada à cozinha e restaurante) apresentaram contagens inadequadas para coliformes termotolerantes. Portanto, os resultados atentam para a necessidade de adoção de medidas corretivas e preventivas nos locais avaliados.

KNYCHALA, M.M. et al. Qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 35, Ed. 140, Art. 948, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AHVENAINEM, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 179-187, 1996.

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**, v. 21, n.2, p. 197-201, 2001.

BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n.2, p. 204-216, 1996.

BOLIN, H.R.; STAFFORD, A.E.; KING JR., A.D.; HUXSOLL, C.C. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 5, p.1319-1321. 1997.

(BRASIL). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): **Resolução nº 12 de 02/01/2002. Estabelece os padrões microbiológicos sanitários para os alimentos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 12 jul, 2010.

(BRASIL). Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para controle de produtos de origem animal e água. Cap VI. **Diário oficial da União**, Brasília, DF, 2002. em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 13 jul, 2010.

COSTA, L.P.; ONOZATO, R.; LEAL, C. R. B.; FERREIRA, A. M. T. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializada em feiras livres de Campo Grande, MS. **XIII Congresso Brasileiro de Nutrição, resumos**, n.18, p.13, 2004.

EFSA - European Food Safety Authority - The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, **The EFSA Journal**, Italy, pp.223, 2009.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, v. 3, 1998. p.332.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: **Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria**, 45, 2000 São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFS car, jul., p. 255-258, 2000.

GELLI, D.S.; TACHIBANA, T.; OLIVEIRA, I.R.; ZAMBONI, C.Q.; PACHECO, J.A.; SPITERI, N. Condições higiênicas-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, vol. 39, p.37-43, 1979.

HELSON, S. Estimating the incidence of food-borne *Salmonella* and effectiveness of alternative control measures using the Dephi method. **Internacional Journal Food Microbiology**, v. 33, p.195-204, 1997.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; MITCHELL, R.T. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. **Journal of Food Protection**, v.66, n.9, p.1581-1586, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2007.

KNYCHALA, M.M. et al. Qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 35, Ed. 140, Art. 948, 2010.

SILVA JR., E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 6ª Ed. São Paulo: Varela, 2005.

VANETTI, M.C.D; Segurança microbiológica em produtos minimamente processados. **In: III Encontro Nacional Sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. Universidade Federal de Viçosa**, p. 30-32. 2004.