

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS ITAQUI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS MINIMAMENTE
PROCESSADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE ITAQUI-RS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DAIANE DE AQUINO SILVA

Itaqui

2013

DAIANE DE AQUINO SILVA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS MINIMAMENTE
PROCESSADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE ITAQUI-RS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências Agrárias

Itaqui

2013

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S586a Silva, Daiane de Aquino
Avaliação Microbiológica de Vegetais Minimamente
Processados Comercializados no Município de Itaqui-RS / Daiane
de Aquino Silva.
28 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2013.
"Orientação: Paula Fernanda Pinto da Costa".

1. Fungos. 2. Hortaliças. 3. Microbiologia. 4.
Processamento Mínimo. 5. Bactérias. I. Título.

DAIANE DE AQUINO SILVA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS MINIMAMENTE
PROCESSADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE ITAQUI-RS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências Agrárias

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 27/09/2013.

Banca examinadora:

Profª MsC. Paula Fernanda Pinto da Costa

Orientador

(UNIPAMPA)

Profª Drª. Luciana Zago Ethur

(UNIPAMPA)

Profª Drª. Paula Ferreira de Araújo Ribeiro

(UNIPAMPA)

Dedico este trabalho a
minha mãe pela paciência
comigo durante a minha
graduação.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me guiar sempre pelo melhor caminho.

A minha orientadora Prof^a Paula Fernanda Pinto da Costa pelos conhecimentos compartilhados e orientação.

A todos os professores do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela sempre disponibilidade e dedicação com os alunos.

As técnicas: Carjone Gonçalves, Giovana Soares, Franciele Pinheiro e Fabiani Moro do laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pampa pela paciência, compreensão, carinho e auxílio técnico nesse trabalho.

“Destino não é uma questão de sorte, mas uma questão de escolhas. Não é uma coisa que se espera, mas que se busca.”

Caio Fernando Abreu

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos Gerais	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 Vegetais minimamente processados	13
3.2 Doenças transmitas por alimentos	15
3.3 Microrganismos indicadores de contaminação	17
3.4 Método de Contagem Padrão em placas	18
3.5 Contagem de Bolores e Leveduras	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Materiais	19
4.2 Métodos	20
4.3 Contagem Padrão em Placas (CPP)	20
4.2.2 Contagem de Bolores e Leveduras (CBL)	21
4.2.3 Análise dos resultados	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
5.1 Contagem Padrão em Placas	21
5.2 Contagem de Bolores e Leveduras	25
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO - AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE ITAQUI-RS.

Daiane de Aquino Silva;

Orientadora: Paula Fernanda Pinto da Costa

Itaqui, 27 de Outubro de 2013

O Processamento mínimo de vegetais foi introduzido no Brasil na década de 90, como alternativa que alia praticidade, rapidez no preparo. No entanto, devido a ausência de conservantes e de tratamentos térmicos podem tornar-se um meio de crescimento adequado para os microrganismos, devido à lesão dos tecidos e ao alto teor de umidade dos vegetais acondicionados, o que aumenta seu potencial de deterioração. Dentre os microrganismos encontrados em produtos minimamente processados (MP), podem ser destacados as leveduras, bolores e bactérias mesófilas. Este trabalho teve como objetivo analisar a qualidade microbiológica de: abóbora, cenoura, maçã e mandioca minimamente processadas e comparar a qualidade microbiológica de amostras de mandiocas adquiridas e comercializadas no município de Itaqui/Rs, através da contagem total de aeróbios mesófilos (CT) e da contagem total de bolores e leveduras (CBL). Para isto, amostras foram adquiridas no comércio local e imediatamente enviadas para o laboratório de microbiologia da instituição Universidade Federal do Pampa, para análise de CBL utilizando o meio de cultura PDA (*Potato dextrose ágar*) e CT com o meio de cultura PCA (*Plate count agar*). As placas contendo meio PCA foram incubadas a 35°C durante 48 horas e as placas contendo PDA foram incubadas a 23°C durante 5 dias, após este período foram escolhidas para contagem as placas de diluições que apresentaram uma faixa entre 25 e 250 colônias para bactérias e 15 a 150 colônias para fungos. Os resultados demonstraram que os valores variaram de 4 a 7,32 log UFC. g⁻¹, para bactérias mesófilas e de 4 a 6 log UFC. g⁻¹ para bolores e leveduras. A legislação brasileira não estabelece limites para a CT e CBL, no entanto, estes métodos tornam-se ferramentas eficazes de controle de qualidade, pois, são de baixo custo e fornecem resultados confiáveis a curto prazo. Diversos autores e legislações de outros países sugerem que contagens superiores a 5,0 log UFC. g⁻¹ para CT e 3,0 log UFC. g⁻¹ para CB podem indicar matéria prima de baixa qualidade, falhas no processamento ou problemas de conservação do produto. Os resultados deste trabalho indicam que os produtos expostos à venda apresentam falhas no processamento, podendo estar associado a riscos de transmissão de doenças veiculadas por alimentos e sugerem a necessidade de aplicação das boas práticas de fabricação pelos estabelecimentos produtores.

Palavras-chave: fungos, hortaliças, microbiologia, processamento mínimo, bactérias.

**ABSTRACT- MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF VEGETABLES
MINIMALLY COMMERCIALY PROCESSED IN THE MUNICIPALITY OF
ITAQUI-RS**

Daiane de Aquino Silva;

Orientadora: Paula Fernanda Pinto da Costa

Itaqui, October 27, 2013

The minimum processing plant was introduced in Brazil in the 90's as an alternative that combines practicality, speed preparation. However, due to the absence of preservatives and heat treatment may become a suitable growth medium for microorganisms due to tissue injury and the high moisture content of the packaged vegetables, which increases the potential for deterioration. Among microorganisms found in minimally processed products (MP) can be highlighted yeasts, molds and mesophilic bacteria. This study aimed to assess the microbiological quality of: pumpkin, carrots, apples and cassava minimally processed and compare the microbiological quality of cassava samples procured and marketed in the municipality of Itaqui / Rs, through the total count of aerobic mesophilic (CT) and the total count of yeasts and molds (CBL). For this, samples were bought locally and immediately sent to the microbiology laboratory of the Federal University of Pampa institution for analysis of CBL using the PDA culture medium (*Potato Dextrose Agar*) and CT with culture medium PCA (*Plate count agar*). The plates containing medium PCA were incubated at 35 ° C for 48 hours and plates containing PDA incubated at 23 ° C for 5 days, after this period were chosen for counting the plates dilutions that showed a range between 25 and 250 colonies for bacteria and 15 150 colonies to fungi. The result showed that the values ranging from 4 to 7.32 log CFU. g⁻¹ for mesophilic bacteria and from 4 to 6 log CFU. g⁻¹ for yeasts and molds. Brazilian law does not set limits to CT and CBL, however, these methods have become powerful tools for quality control, because they are inexpensive and provide reliable results in the short term. Several authors and laws of other countries suggest that scores above 5.0 log CFU. g⁻¹ for CT and 3.0 log CFU. g⁻¹ to CB feedstock may indicate poor quality, faults or problems in the processing or preservation of the product. The results of this study indicate that the products displayed for sale have failed processing, may be associated with risk of transmission of foodborne illness and suggest the need for application of good manufacturing practices for manufacturing establishments.

Key words: fungus, vegetables, microbiology, minimal processing, bacteria.

Lista de Figuras

Figura 1. (A) amostra de maçã MP, (B) amostra de abóbora MP, (C) amostra de mandioca (MP).....	19
Figura 2. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas em vegetais minimamente processados.....	21
Figura 3. Maçã em meio PCA diluição 10^3 24horas após a inoculação.....	22
Figura 4. Contagem Total de bactérias Mesófilas em amostras de mandioca.....	23
Figura 5. Figura 5 (A) Amostra de Mandioca 1 em meio PCA 10^2 após 24 horas de incubação, (B) Amostra de Mandioca 2 em meio PCA 10^2 após 24 horas de incubação.....	24
Figura 6 Contagem Total de Bolores e Leveduras em Vegetais minimamente processados..	24
Figura 7. A) Amostra de Cenoura em meio BDA após 5 dias de incubação; (B) Amostra de Abóbora em meio BDA após 5 dias de incubação.....	25
Figura 8. Contagem Total de Bolores e Leveduras em amostras de mandioca.....	26

1. INTRODUÇÃO

As alterações nos hábitos de consumo de vegetais sugerem uma tendência ao uso de produtos mais convenientes, ou seja, de fácil preparo, essa mudança tem orientado o setor de alimentos na busca deste propósito. Produtos minimamente processados são definidos como frutas e hortaliças, ou suas combinações, fisicamente alteradas em sua forma original, mas que mantêm seu frescor a o conceito de alimento saudável à praticidade de preparo.

Os alimentos minimamente processados estão ganhando espaço no mercado devido à sua praticidade no preparo das refeições e a sua qualidade higiênico-sanitária, pois ao passar por algum processo de sanitização, o alimento deve estar isento de microrganismo patogênico ou com quantidades abaixo do permitido pela legislação. Segundo Jay (2005), 30% das hortaliças destinadas ao consumo humano sofrem alterações microbianas, por organismos deterioradores e/ou potencialmente patogênicos.

Nos últimos anos, o setor de alimentação vem enfrentando mudanças significativas, fruto da concorrência e da competitividade entre as empresas. Essas mudanças envolvem inovações tecnológicas em equipamentos, em produtos alimentícios e em processos produtivos. A inovação relacionada a produtos alimentícios diz respeito à utilização de alimentos de origem vegetal pré elaborados, considerados de quarta geração, que são alimentos alterados fisicamente a partir de sua forma original (processo de descascamento e corte em produtos crus), embalados ou pré embalados, prontos para o uso, que mantêm seu frescor e qualidade nutricional. O setor alimentício exige cada vez mais qualidade e o crescimento do mercado de vegetais minimamente processados (MP) é associado à uma maior praticidade no preparo, uma maior vida útil e preservação das características sensoriais e nutricionais do alimento, devido a manipulação o risco de contaminação desses produtos é consideravelmente mais elevado (DEGIOVANNI *et al*,2010).

A contaminação dos alimentos (MP) por fungos e bactérias, ocorre inicialmente no ambiente natural como o solo. A manipulação destes favorece uma contaminação cruzada, ocorrendo por meio dos manipuladores dos alimentos ou dos utensílios utilizados em seu processamento. Os danos físicos ocasionados pelo processamento do alimento, como corte e descascamento ou por injúrias, causam a liberação de nutrientes e enzimas intracelulares que favorecem a atividade enzimática e a proliferação microbiana, prejudicando a aparência e acelerando a deterioração (FANTUZZI *et al*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a qualidade microbiológica de vegetais processados comercializadas em Itaqui-Rs.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliação da qualidade microbiológica de maçã, cenoura e abóbora, minimamente processadas, comercializadas em Itaqui, através do método de contagem total de bactérias, bolores e leveduras.

Avaliar a qualidade microbiológica de mandioca minimamente processada, de diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Itaqui/Rs.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Vegetais minimamente processados

Nos últimos anos, os hábitos alimentares das pessoas sofreram mudanças significativas resultantes do apelo do marketing para o consumo de frutos e hortaliças frescas, com a ideia de que são sinônimos de vida saudável (OETTERER, 2006).

No Brasil foi introduzido, na década de 1990, o método de processamento mínimo de frutas e hortaliças, que corresponde à tecnologia alternativa que alia praticidade, rapidez no preparo e higienização ao aproveitamento de produtos anteriormente rejeitados, como por exemplo vegetais com tamanhos fora dos padrões (OETTERER, 2006).

A agregação de valor aos produtos minimamente processados impulsiona a competitividade e a incorporação de métodos alternativos de comercialização. Dessa forma, é possível evitar perdas que refletem de modo considerável nas esferas social e econômica. Para tanto, deve-se priorizar o uso de matérias primas de qualidade superior, com o objetivo de racionalizar as etapas inerentes a cadeia produtiva, como cultivo, colheita, processamento, embalagens, armazenamento e comercialização (OETTERER, 2006).

Segundo Bonnas *et al.* (2005), Produtos vegetais minimamente processados podem ser definidos como frutas e hortaliças que tenham sido fisicamente alteradas, mas que permanecem no estado fresco. Os alimentos minimamente processados estão ganhando espaço no mercado devido a sua praticidade no preparo das refeições e a sua qualidade higiênico-sanitária, pois ao passar por algum processo de sanitização, o alimento deve estar

isento de microrganismo patogênico ou com quantidades abaixo do permitido pela legislação. Cerca de 30% de frutas e hortaliças próprias para o consumo humano sofrem alterações por microrganismos deterioradores e/ou potencialmente patogênicos, a contaminação destes alimentos por fungos e bactérias, ocorre inicialmente no ambiente natural como o solo (BONNAS *et al*, 2005).

Nesse cenário, onde os consumidores buscam cada vez mais uma alimentação saudável é comum encontrarmos nos grandes supermercados numerosos produtos de pronto consumo disputando a mesma prateleira com produtos *in natura*, estando aqueles acondicionados em embalagens atrativas e convenientes às expectativas dos consumidores, julgadores em potencial (OETTERER, 2006).

O sucesso da técnica de processamento mínimo depende, no entanto, da sanidade em todas as etapas envolvidas na produção dos alimentos, com o objetivo de garantir sua qualidade, prolongar sua vida útil e manter o mesmo frescor apresentado pelas frutas e hortaliças *in natura* (JAY, 2005).

Frutas e hortaliças submetidas a processamento mínimo envolvem a manipulação de tecidos vivo, que continuam fisiologicamente ativos. Logo, para a sua conservação deve-se considerar parâmetros como respiração, transpiração, produção de etileno, características sensoriais inerentes a cada cultivar, assim como também a suscetibilidade ao ataque de microrganismos (OETTERER, 2006).

Portanto produtos minimamente processados requerem como suporte à aplicação de tecnologias adequadas, o conhecimento da fisiologia de cada matéria prima e dos princípios básicos relacionados à área de ciência e tecnologia de alimentos (OLIVEIRA, 2008). O conhecimento existente sobre a fisiologia e os requerimentos de manuseio pós-colheita indicam que frutas e hortaliças minimamente processadas se comportam diferentemente e, portanto, devem ser manuseadas de maneira distinta dos produtos intactos. Isso significa que o conhecimento acumulado durante décadas sobre a fisiologia e o manuseio comercial de frutas e hortaliças deve ser reexaminado e novos estudos devem ser desenvolvidos para cada produto minimamente processado (MORETTI,2007).

A manipulação dos alimentos minimamente processados favorece uma contaminação cruzada, ocorrendo por meio dos manipuladores dos alimentos ou dos utensílios utilizados em

seu processamento (FANTUZZI *et al.*, 2004). A contaminação pode ser agravada devido à irrigação com águas não tratadas ou devido à utilização de fertilizantes inadequados.

No Brasil, algumas instituições, como o Instituto de Tecnologia de Alimentos, em São Paulo, Embrapa Hortaliças, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, UNESP em Jaboticabal, vêm desenvolvendo projetos sobre hortaliças minimamente processadas (FONTES *et al.*, 2007). A Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 prevê padrões microbiológicos para hortaliças e frutas frescas, *in natura*, preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas), sanitizadas, refrigeradas ou congeladas, para o consumo direto, estabelece limites alguns microrganismos específicos, como por exemplo, ausência em 25 g para *Salmonella sp.*, 10^2 NMP.g⁻¹ para coliformes a 45 °C (FONTES *et al.*, 2007).

Segundo Souza *et al.* (2012), alimentos minimamente processados em particular, apresentam maiores problemas microbiológicos que os outros vegetais, por sofrer maior manipulação e possuir maior relação área/volume. Diversos estudos foram desenvolvidos objetivando verificar a sua qualidade microbiológica pela avaliação da presença de microrganismos tais como: bactérias aeróbias mesófilas, Coliformes totais, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, bolores e leveduras.

3.2 Doenças transmitidas por alimentos

Segundo Zandonadi *et al.* (2007), a alimentação é necessidade básica para qualquer sociedade. Influencia a qualidade de vida por ter relação com a manutenção, prevenção ou recuperação da saúde. Deve ser saudável, completa, variada, agradável ao paladar e segura para, assim, cumprir seu papel. As transformações no mundo contemporâneo provocaram mudanças significativas na alimentação e nos hábitos alimentares dos seres humanos, que passaram a usufruir cada vez menos do universo doméstico. Essas mudanças foram ocasionadas por fatores que perpassam a urbanização, a industrialização, a profissionalização das mulheres, a elevação do nível de vida e de educação, o acesso mais amplo da população ao lazer, a redução do tempo para o preparo e/ou consumo do alimento, as viagens, entre outros fatores.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), A carga global de doenças transmitidas por alimentos é atualmente desconhecida, estima-se que em 2005, cerca de 1,8 milhões de pessoas no mundo morreram devido às doenças diarreicas, em grande parte causados por contaminação de alimentos e água potável (NEWELL *et al.*, 2010).

Existem mais de 200 agentes microbianos, químicos ou físicos conhecidos que podem causar doença, quando ingeridos. Doenças causadas por agentes patogênicos transmitidos por alimentos além de constituírem um grave problema de saúde pública causam grande impacto na economia mundial (NEWELL *et al*, 2010).

A ocorrência de surtos alimentares é atribuída a diversos fatores, como as transformações socioeconômicas, globalização do mercado de alimentos, transformação no estilo de vida da população, destacando-se a redução das famílias, aumento da inserção feminina no mercado de trabalho, aumento das refeições coletivas e a preferência dos consumidores por alimentos minimamente processados, ou prontos para o consumo (OLIVEIRA, 2008).

Os progressos realizados no sentido de se compreender a natureza das doenças causadas pelos alimentos foram sempre bastantes lentos. Na idade média, milhares de pessoas morriam de ergotismo sem que se soubessem de que se tratava de uma intoxicação aguda (OLIVEIRA, 2008).

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos microrganismos patógenos, causadores de diversas perturbações fisiológicas nas pessoas que os consomem. Os alimentos que, eventualmente, estejam contaminados por microrganismos causadores de doenças, ao serem ingeridos, permitem que os patógenos ou os seus metabolitos invadam os fluídos ou os tecidos do hospedeiro, causando algumas doenças graves (OLIVEIRA, 2008).

Segundo Oliveira (2008), a expressão “doenças de origem alimentar” é tradicionalmente utilizada para designar um quadro sintomatológico, caracterizado por um conjunto de perturbações gástricas, envolvendo geralmente vômitos, diarreia, febres e dores abdominais, que podem ocorrer individualmente ou em combinação. As doenças de origem alimentar podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, bolores, protozoários e vírus. As bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem, de longe, o grupo microbiano mais importante e mais vulgarmente associado às doenças transmitidas pelos alimentos (OLIVEIRA, 2008).

Os alimentos podem ser contaminados por bactérias patogênicas para o homem, como resultado de deficientes condições de higiene durante o seu processamento, quer a partir de pessoas ou animais doentes, quer a partir de fezes provenientes de indivíduos infectados. Os

alimentos podem, também, constituir um perigo para a saúde pública, devido ao crescimento excessivo de populações bacterianas, à superfície ou no interior dos mesmos, oriundas do meio ambiente capazes de produzir toxinas (exotoxinas), que ao serem ingeridas com o alimento podem causar graves problemas (OLIVEIRA, 2008).

Em menor escala, os bolores podem também ser responsáveis por doenças alimentares, devido à possibilidade de crescimento de determinadas espécies, capazes de produzir toxinas fúngicas, as micotoxinas, na superfície dos alimentos, nomeadamente, naquelas situações em que as condições de conservação e armazenamento sejam defeituosas. Por outro lado, um alimento pode ficar contaminado com micotoxinas sem que, para isso, haja necessidade de ocorrência de crescimento de bolor no alimento (OLIVEIRA, 2008).

Segundo Cunha *et al* (2006), embora as estatísticas brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar em nosso país seja bastante elevada. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais o abastecimento de gêneros alimentícios é considerado seguro do ponto de vista de higiene e saúde pública, a ocorrência de doenças desta natureza é significativa e vem aumentando, apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de alimentos.

3.3 Microrganismos indicadores de contaminação

Segundo Franco *et al* (2003), microrganismos indicadores são grupos de microrganismos que quando, presentes em números elevados em alimentos poderão causar a deterioração e/ou a redução da vida de prateleira. Essas contagens fornecem informações gerais sobre as condições durante o processamento de alimentos, assim como sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas, durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO, 2003).

Microrganismos indicadores vem sendo utilizados na avaliação de água há longo tempo, e mais recentemente na de alimentos, devido as dificuldades encontradas na detecção de microrganismos patogênicos, como, por exemplo, *Salmonella* (FRANCO,2003).

A contaminação de alimentos por microrganismos, a sua proliferação em termos de saúde pública e a preocupação em desenvolver métodos de controles em empresas alimentícias vem a muito tempo crescendo no mundo todo. O alimento por si próprio é um meio de cultura excelente para a proliferação de microrganismos. E é através destes

microrganismos que podemos avaliar o grau e a procedência da contaminação, bem como o período previsto para o consumo do alimento antes da sua deterioração. O alimento é quem determina qual o microrganismo é capaz ou incapaz de se desenvolver. Conhecendo as características do alimento, podemos, prever a flora microbiana que nele poderá se multiplicar. Daí se dá a importância da análise microbiológica, pois inúmeros métodos laboratoriais podem ser utilizados para investigar a ausência ou presença destes microrganismos (CUNHA, 2006).

3.4 Método de Contagem Padrão em placas

A análise microbiológica de alimentos objetiva a detecção ou a enumeração de organismos vivos. Em função da multiplicidade de grupos, gêneros e espécies que podem estar presentes, um grande número de ensaios são utilizados, que podem ser de dois tipos: ensaios qualitativos que verificam a presença ou ausência de microrganismos alvo em uma dada quantidade da amostra, sem quantificar, e ensaios quantitativos, que determinam a quantidade dos microrganismos alvo na amostra, geralmente por unidade de massa ou volume. Cada um desses ensaios segue procedimentos diferenciados, que dependem do microrganismo alvo, mas a maioria deles utiliza as mesmas técnicas culturais básicas de microbiologia. Entre essas técnicas destaca-se a contagem padrão em placas (SILVA *et al*, 2010).

Segundo Jay *et al* (2005), pelo método de contagem padrão em placas, porções de amostras de alimentos são misturadas ou homogeneizadas, diluídas serialmente em um diluente apropriado, plaqueadas sobre ou dentro de um meio Agar adequado, o qual é incubado sob temperatura apropriada por um determinado tempo, sendo então todas as colônias visíveis contadas por um contador eletrônico ou Quebec.

A contagem padrão em placa é utilizada tanto para a quantificação de grandes grupos microbianos, como os aeróbios mesófilos, os aeróbios psicotróficos, os bolores e leveduras, bactérias lácticas, como também para gêneros e espécies em particular, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*. O procedimento básico é a inoculação da amostra homogeneizada (e suas diluições) em um meio sólido (com Agar), contido em placas de petri, seguida da incubação das placas até crescimento visível. A versatilidade da técnica é decorrente do princípio envolvido na contagem, baseado na premissa de que, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, cada célula microbiana presente na amostra irá formar uma colônia isolada, para a expressão dos

resultados é realizada uma relação entre o número de colônias e o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (SILVA, 2010).

3.5 Contagem de Bolores e Leveduras

A contagem de bolores e leveduras baseia-se na verificação da capacidade de bolores e leveduras se desenvolverem em meios de culturas com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação em torno de 25°C, o pH promove a seletivamente, o crescimento de fungos e inibe a maioria das bactérias presentes na amostra de alimento.

Bolores são fungos filamentosos, multicelulares podendo estar presentes no solo, ar, água e em matérias orgânicas em decomposição. Leveduras são fungos não filamentosos normalmente disseminados por insetos vetores, pelo vento e pelas correntes aéreas.

A presença de bolores e leveduras viáveis e em índice elevado nos alimentos podem fornecer varias informações, tais como condições higiênicas deficientes de equipamentos, falhas no processo ou matéria prima com contaminação excessiva, assim como a provável presença de micotoxinas nos alimentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As amostras de maçã, cenoura e mandioca foram adquiridas em comércio local em suas embalagens originais de polietileno. As amostras de abóbora em pedaços sem casca e acondicionadas em bandejas de polietileno expandido envoltas com filme de PVC foram adquiridas no comércio local e imediatamente enviadas para o laboratório de microbiologia da instituição Universidade Federal do Pampa- Itaqui, para análise de Contagem de Bolores e Leveduras utilizando o meio de cultura BDA (*Potato dextrose ágar*) e Contagem Padrão em Placas com o meio de cultura PCA (*Plate count agar*). As amostras de maçã, abóbora e mandioca podem ser observadas na figura 1 (A,B e C).



(A)



(B)



(C)

Figura 1. (A) amostra de maçã MP, (B) amostra de abóbora MP, (C) amostra de mandioca (MP).

Todas as amostras foram adquiridas em suas embalagens originais, dentro do prazo de validade informado pelo fabricante. Foram transportados em caixas isotérmicas e armazenados sob-refrigeração até o momento das análises

4.2 Métodos

4.3 Contagem Padrão em Placas (CPP)

A Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias foi realizada através do método de contagem padrão em placas, conforme metodologia descrita por Silva *et al* (2010). Sendo realizada em duplicata e seis diluições. Retirou-se assepticamente 25gr das amostras de alimentos, as frações foram acondicionadas em saco estéril e completadas com água peptonada. As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador de alimentos do tipo stomacher por 30 segundos e preparou-se diluições sucessivas. Pipetou-se alíquotas de 1mL de cada diluição para placas de Petri esterilizadas, em duplicata. Em cada placa de petri foram adicionados 15-20 mL de ágar batata dextrose, previamente fundido e resfriado. Homogeneizou-se com movimentos em forma de 8, por 10 vezes, onde alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas para as placas de Petri contendo 15-20 mL de meio de cultura PCA (*Plate count agar*) através do método de inoculação em superfície.

As placas foram incubadas em câmara B.O.D a 35° durante 48 horas. A contagem foi realizada em contador de colônias marca Marconi, modelo MA- 6000. As colônias foram então enumeradas nas placas que apresentaram número de colônias entre 25 e 250. Os resultados foram expressos em $\log \text{UFC.g}^{-1}$ de amostra.

4.2.2 Contagem de Bolores e Leveduras (CBL)

A contagem de leveduras e bolores foi realizada em duplicata de acordo com a metodologia descrita por SILVA *et al* (2010), metodologia semelhante a utilizada para o método de contagem padrão em placas, utilizando o meio PDA (*Potato Dextrose Agar*), como meio de cultura. deixando solidificar os meios inoculados a temperatura ambiente que posteriormente foram incubadas em posição invertida, a 25°C por 5 dias.

4.2.3 Análise dos resultados

O tratamento estatístico dos resultados foram por obtenção da média dos resultados, desvio padrão e os gráficos foram obtidos através do programa Excel 2007.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Contagem Padrão em Placas

A contagem padrão em placas (CPP) tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também ideia sobre seu tempo útil de conservação. Esta contagem detecta em um alimento, o número de bactérias aeróbias ou facultativas e mesófilas presentes tanto sob a forma vegetativa quanto esporulada. A presença em grande número de colônias pode indicar: matérias-primas excessivamente contaminadas; limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas; higiene inadequada na produção; condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos, ou uma combinação destas circunstâncias (OLIVEIRA, 2008).

Na Figura 2 observa-se a contagem total de aeróbios mesófilos em vegetais minimamente processados.

Os valores encontrados no presente trabalho para abóbora foram de 7,19 log UFC.g⁻¹, para cenoura 4,6 log UFC.g⁻¹ e para maçã 6,12 log UFC.g⁻¹. Pelo fato de não existir legislação indicando limites para contagem de bactérias mesófilas, foram utilizados os parâmetros apresentados pela literatura, que indica a comercialização de vegetais minimamente processados e similares com contagem total de bactérias aeróbicas mesófilas de até 5log UFC. g⁻¹, sendo estes os parâmetros tidos como aceitáveis pela literatura (ZANDONADI, FONTES).

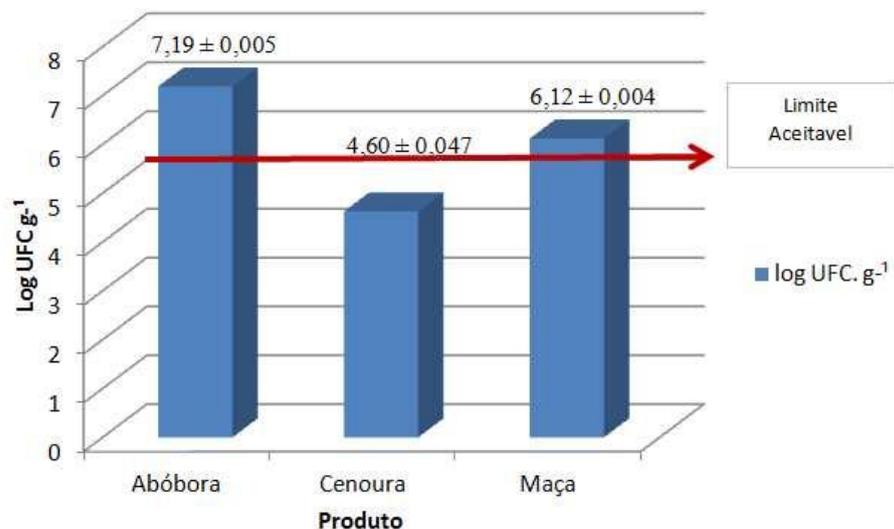


Figura 2 Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas em vegetais minimamente processados.

Dos valores encontrados somente a amostra de cenoura está dentro dos padrões aceitáveis para consumo, resultado semelhante aos valores encontrados por Lima *et al* (2003) que não constatou deterioração do produto em até 12 dias de armazenamento.

A contagem de bactérias mesófilas encontradas nas amostras de cenoura e abóbora está semelhante aos valores descritos por Moreira (2009), o qual relatou em seu estudo que a contagem de bactérias mesófilas em Agar padrão ou meio equivalente, encontrada em vegetais MP, variou de 3 a 9 log UFC.g⁻¹. A contagem dos microrganismos mesófilos permite avaliar as condições microbiológicas de processamento do alimento. Números elevados geralmente diminuem seu tempo de vida útil (Moreira, 2009).

Os resultados encontrados nas amostras de maçã, 6,12 UFC.g⁻¹ diferem dos valores encontrados por Fontes *et al* (2009), 4,18 log UFC.g⁻¹ para o mesmo tipo de amostra. Este resultado representa condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante o processamento. O elevado número de unidades formadoras de colônias na amostra de maçã pode ser observado na figura 3.

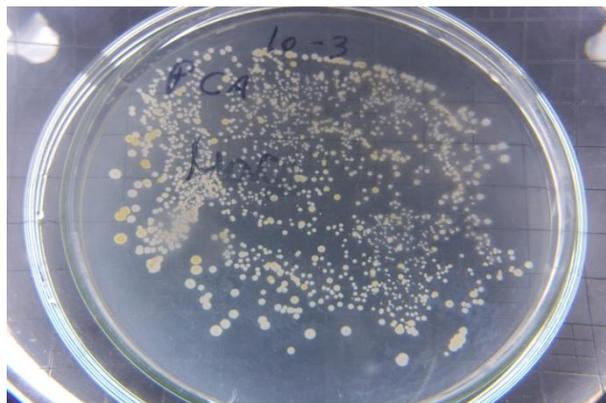


Figura 3 Maça em meio PCA diluição 10^3 24horas após a inoculação

Os valores da abobora MP estão de acordo com o estudo apresentado por Sasaki *et al* (2006) que apresentou valores de $7,32 \log \text{UFC.g}^{-1}$ encontrados para contagem de bactérias mesófilas, sendo a amostra considerada imprópria para o consumo. Os autores do trabalho relacionam o alto índice de contaminação com o aumento da superfície pelo corte, dano e disponibilidade de nutrientes causados pelo processamento mínimo, fornece condições que aumentam o número e os tipos de microrganismos. Além, disso, o aumento da manipulação desses produtos possibilita a contaminação por patógenos.

Entre as amostras analisadas as 4 amostras de mandiocas MP foram as que obtiveram os resultados mais expressivos, Para bactérias Mesófilas os resultados encontrados nas amostras foram: mandioca 1 $7,23 \text{ Log UFC.g}^{-1}$, mandioca 2 $7,19 \text{ Log UFC.g}^{-1}$; mandioca 3 $7,21 \text{ Log UFC.g}^{-1}$; mandioca 4 $7,32 \text{ Log UFC.g}^{-1}$. Valores muito acima de 5 Log UFC.g^{-1} tido como aceitável pela literatura (LUND, 2004 e 2005), para produtos vegetais *in natura*, como podemos observar na figura 4, no entanto não existe uma legislação específica para este tipo de produto A RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da ANVISA (2003) apenas estabelece limites para a contagem de coliformes fecais e ausência de *Salmonella*. Porém raízes, tubérculos e similares pertencem à categoria frescos, “*in natura*”, preparados, sanificados, refrigerados ou congelados para consumo direto.

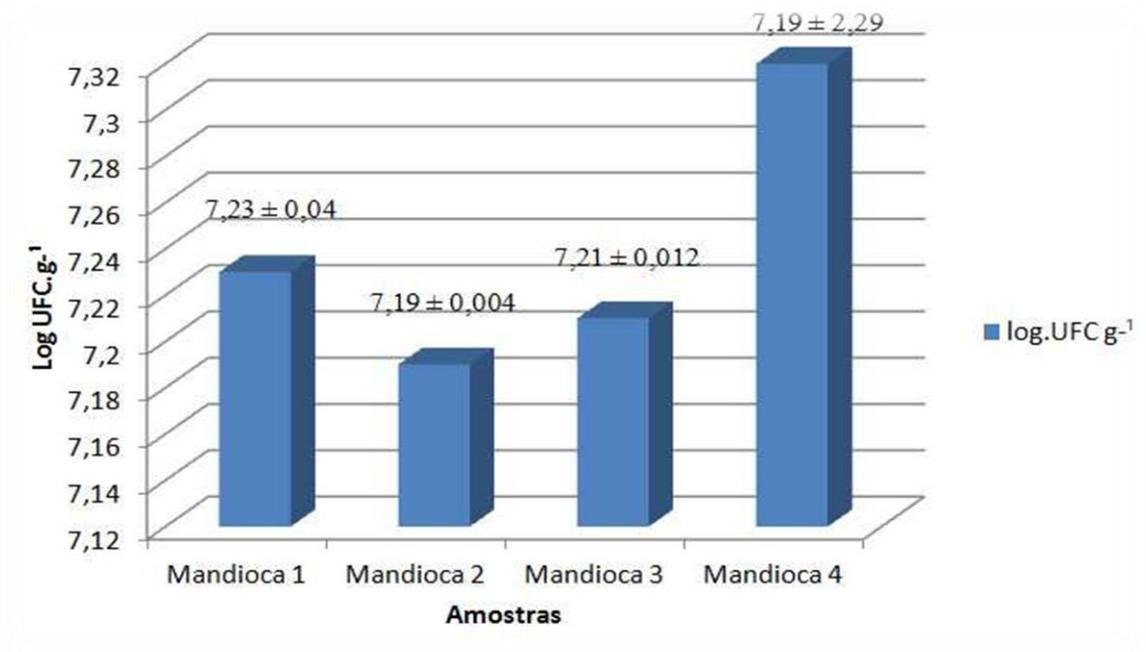


Figura 4 Contagem Total de bactérias Mesófilas em amostras de mandioca

Segundo Lund *et al* (2005), a produção de mandioca minimamente processada (MMP) tem sido proposta como alternativa para promover a ampliação do período de oferta e disponibilizar um alimento mais prático, ou seja, descascado, limpo e higienizado, pronto para ser utilizado. As principais operações unitárias na produção de MMP são a seleção, lavagem, corte, descascamento, lavagem, sanitização, centrifugação, embalagem e refrigeração ou congelamento. Um dos problemas significativos detectados em MMP comercializada no mercado da Região Sul do estado do Rio Grande do Sul é a elevada carga microbiana presente no produto. Como podemos observar na figura 5, Lund *et al.* (2004), analisando produtos de Mandioca MP, detectaram contagens de mesófilos acima de 7,67 log UFC.g⁻¹, segundo o autor a presença de uma elevada carga microbiana em mandioca é normal, considerando-se que se tratam de raízes e o solo é fonte da maioria dos microrganismos de importância agroalimentar. Porém, durante o processamento, devem ser adotadas medidas preventivas que reduzam a contaminação e eliminem os microrganismos potencialmente causadores de intoxicações alimentares.

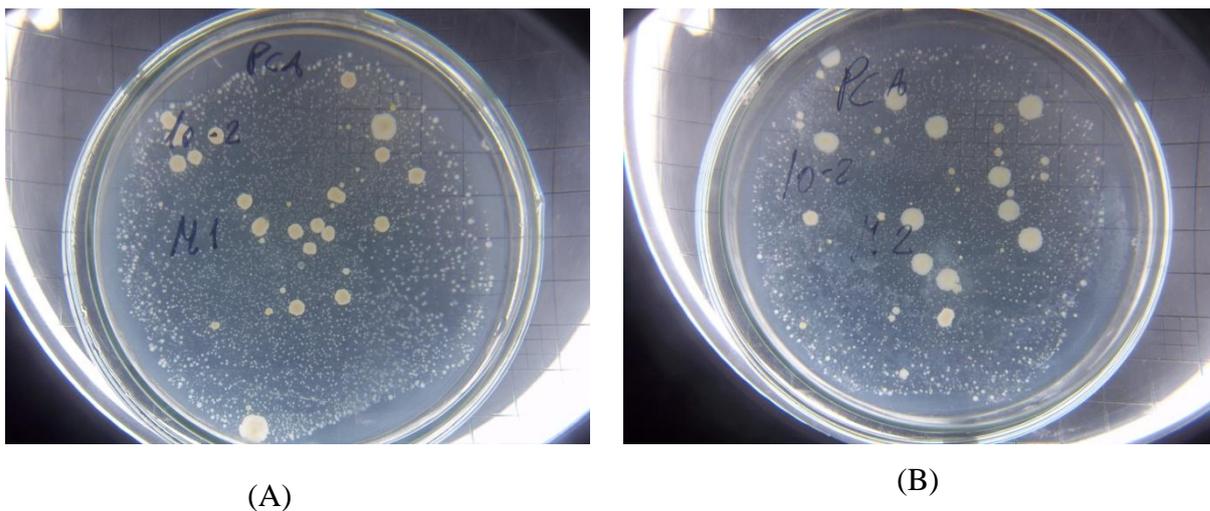


Figura 5 (A) Amostra de Mandioca 1 em meio PCA 10^2 após 24 horas de incubação, (B) Amostra de Mandioca 2 em meio PCA 10^2 após 24 horas de incubação

5.2 Contagem de Bolores e Leveduras

Dentre os microrganismos, ressalta-se a importância de se verificar a presença de espécies de bolores e leveduras, pois alguns são produtores de micotoxinas que podem induzir a doenças. Como os microrganismos são dispersos no meio pode ocorrer contaminação dos vegetais, antes e após sua colheita, como também durante o processamento.

Na Figura 6 estão descritas as contagens de bolores e leveduras nos produtos avaliados. Observa-se que o crescimento foi menor em relação às bactérias, porém todas as amostras apresentaram valores acima do limite considerado aceitável pela literatura que é de $3,0 \log \text{ UFC/g}$ (BEZERRA *et al*, 2002; LUND *et al*, 2004).

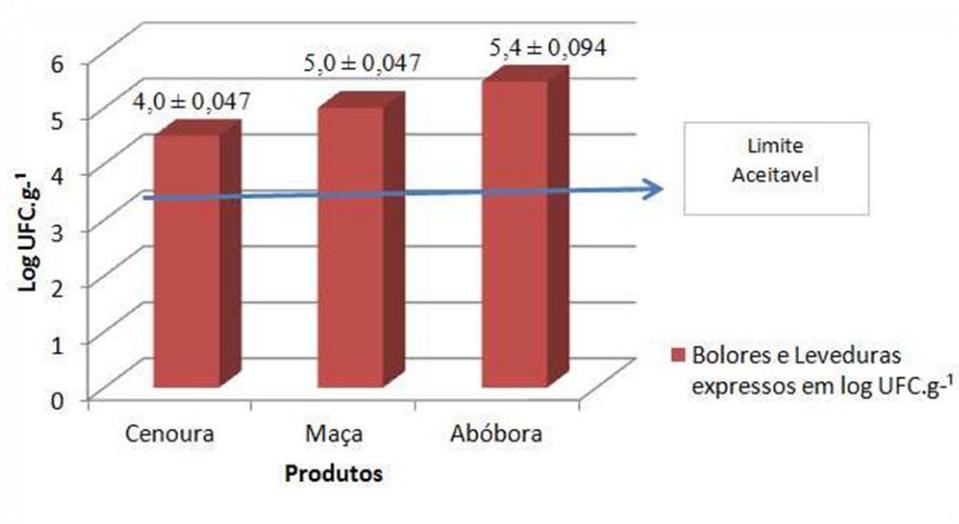


Figura 6 Contagem Total de Bolors e Leveduras em Vegetais minimamente processados.

A contagem de bolors e leveduras apresentou valores muito elevados, 4 log UFC.g⁻¹ para a amostra de cenoura, 5 log UFC.g⁻¹ para amostras de maçã e 5,4 log UFC.g⁻¹ para as amostras de abóbora respectivamente. Placas com amostras inoculadas de cenoura e abóbora podemos observar na figura 7. Diante dos resultados encontrados, nota-se que as amostras estão em desacordo com o tido como aceitável pela literatura e inadequadas para o consumo humano.

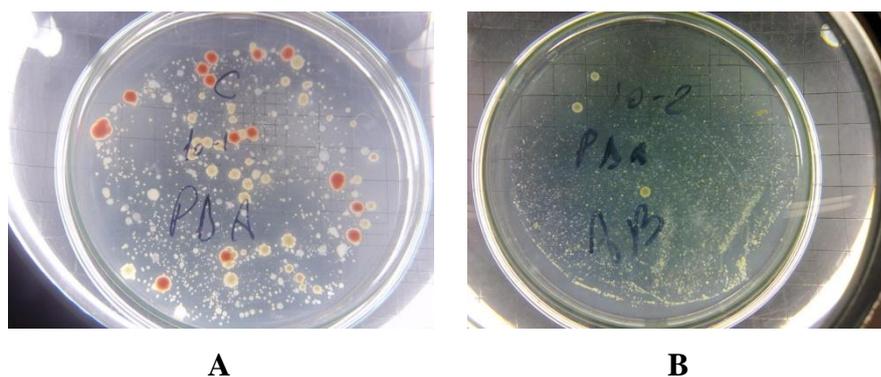


Figura 7 – (A) Amostra de Cenoura em meio BDA após 5 dias de incubação; (B) Amostra de Abóbora em meio BDA após 5 dias de incubação

Os resultados para contagens de bolors e leveduras da amostras de mandiocas MP estão expressos na Figura 8 e apresentam os seguintes valores: mandioca 1 4 Log UFC.g⁻¹;

mandioca 2 $6,16 \text{ Log UFC.g}^{-1}$; mandioca 3 4 Log UFC.g^{-1} ; mandioca 4 6 Log UFC.g^{-1} . Esses resultados estão de acordo com o estudo de Lund *et al* (2005), que determinou valores acima 5 Log UFC.g^{-1} para amostras de mandiocas minimamente processadas.

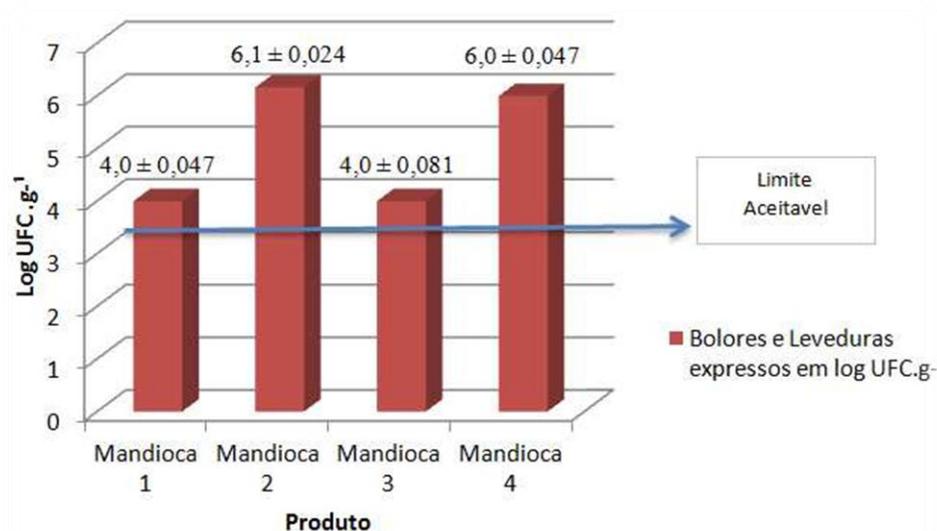


Figura 8 Contagem Total de Bolores e Leveduras em amostras de mandioca

O conjunto de resultados obtidos indica que a mandioca é uma matéria-prima com elevada carga microbiana, com risco significativo de origem microbiológica, demonstrado pela presença de altas contagens de microrganismos. Isso também foi relatado por Oliveira *et al.* (2008), e pelo estudo de Lund *et al* (2004). Por utilizar matéria-prima de origem vegetal, que está sujeita a diversas fontes de contaminação microbiana ao longo do seu cultivo e processamento, como água de irrigação, manipuladores, solo, equipamentos e utensílios e água, a implementação de um sistema de garantia de qualidade por unidades que processam esse tipo de produto torna-se necessária (BONNAS,2005).

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que os produtos analisados, apresentam falhas no processamento, podendo estar associado a riscos de transmissão de doenças veiculadas por alimentos e sugerem a necessidade de aplicação das boas práticas de fabricação pelos estabelecimentos produtores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZERRA. V.S; PEREIRA. R; CARVALHO.V. Raízes de mandioca minimamente processadas: Efeito do branqueamento na qualidade e na conservação. Ciênc. agrotec., Lavras, v.26, n.3, p.564-575, mai./jul., 2002.

BONNAS, D.S. SILVA, C.C. SILVA, S.A. FERREIRA, I.M. Qualidade higiênico-sanitária de vegetais minimamente processados, comercializados no município de Uberlândia, MG. Rev. Hig. Alim., vol.19, p. 100 – 103, 2005.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01.rdc.htm. Acesso em 30 de agosto de 2013.

CUNHA.M.A; SILVA.M.R. Métodos de Detecção de Microrganismos Indicadores. Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias, v.1, n.1, p.09-13, jan-jun 2006.

DEGIOVANNI, Gabriel Carvalho . Hortaliças in natura ou minimamente processadas em unidades de alimentação e nutrição: quais aspectos devem ser considerados na sua aquisição?. Rev. Nutr. [online]. 2010, vol.23, n.5, pp. 813-822.

FANTUZZI, E; PUSCHMANN, R; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. Rev. Ciên. Tec. de Alim, v.24, p. 207-211, 2004.

FONTES, Luciana Cristina Brigatto; SARMENTO, Silene Bruder Silveira and SPOTO, Marta Helena Fillet. Características sensoriais e microbiológicas de maçãs minimamente processadas recobertas com películas. Ciênc. Tecnol. Aliment. [online]. 2007, vol.27, n.1, pp. 91-98. ISSN 1678

FRANCO, Bernadette D. G. M.; Landgraf, Mariza. Microbiologia dos alimentos. 1 ed. 1996 e 2 ed. 2003, São Paulo: Ed. Atheneu.

JAY, James M. Microbiologia de alimentos. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005. 711 p.

LIMA, Keila S. Cople . Cenouras minimamente processadas em embalagens com atmosferas modificadas e tratadas com radiação gama: avaliação microbiológica, físico-química e química. Ciênc. Tecnol. Aliment. [online]. 2003, vol.23, n.2, pp. 240-250. ISSN 1678-457X.

LUND, D.G. Qualidade microbiológica de mandioca minimamente processada. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004. No prelo

LUND, Daniela Guerra; PETRINI, Lelis Aparecida; ALEIXO, José Antonio Guimarães and ROMBALDI, Cesar Valmor. Uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. Cienc. Rural [online]. 2005, vol.35, n.6, pp. 1431-1435. ISSN 0103-8478.

MOREIRA. G.C; Vieites.R.L; Evangelista.R.M; Avaliação microbiológica de melão Cantaloupe minimamente processado submetido a doses de radiação gama. Cascavel, v.2, n.2, p.86-95, 2009.

MORETTI, Celso Luiz. Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças / Celso Luiz Moretti — Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 531 p.

Newell, DG Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H. ... & Kruse, H. (2010). Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. International Journal of Food Microbiology 139 (2010) S3–S15

OETTERER. Marília; Aparecida. M; Regitano. B; Spoto. M.H. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Ed Manole, cap. 10. Pg 453-510. 2006

OLIVEIRA, Maria Aparecida. Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella Sp. E Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria monocytogenes*. Dissertação de Mestrado. USP/ Ribeirão Preto, 2008.

SILVA , Neusely da. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Valéria Christina Amstalden - São Paulo : Livraria Varela, 2010.

SOUSA, T. M. ; CUNHA NETO, A. ; HERNANDES, T. ; SOUTO, P. C. S. Microrganismos Patogênicos e indicadores de condições Higiênico- sanitária em carne moída comercializada na cidade de barra do Garças, MT. Acta Veterinaria Brasilica, v.6, n.2, p.124-130, 2012.

ZANDONADI, Renata Puppín et al. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. Rev. Nutr. [online]. 2007, vol.20, n.1, pp. 19-26. ISSN