

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE COUVE MINIMAMENTE PROCESSADA COMERCIALIZADA EM SUPERMERCADOS DE BRASÍLIA, DF.

Talita Araújo Barbosa

Ylka Jannielly Barbalho de Souza

Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Daniel Oliveira Freire, Daniela Castilho Orsi

Universidade de Brasília. Faculdade de Farmácia. Ceilândia, Brasília, DF.

danielacastilhoorsi@gmail.com

RESUMO

No Brasil, a couve minimamente processada é comercializada durante todo o ano e geralmente é considerada segura para o consumo pelos consumidores. Este estudo avaliou a qualidade microbiológica de seis diferentes marcas de couve minimamente processada comercializadas em supermercados de Brasília. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicrotóficas, determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes e identificação molecular de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* por sequenciamento de DNA. Os resultados revelaram que as amostras de couve minimamente processada apresentaram baixa qualidade microbiológica. Coliformes termotolerantes foram encontrados em todas as amostras de couve minimamente processada, com populações superiores a 2 log NMP/g em metade das amostras. Após o sequenciamento de DNA, *E. coli* O157:H7 foi

identificada em 2 das 6 amostras e *Salmonella enteritidis* foi identificada em 1 das 6 amostras. *Listeria monocytogenes* foi encontrada em metade das amostras, sendo que a presença desta bactéria é geralmente associada a um período excessivo de armazenamento ou estocagem em temperaturas abusivas. Estes resultados mostraram que a couve minimamente processada exposta ao consumo nos supermercados de Brasília pode ser um veículo para a transmissão de bactérias patogênicas e indicaram a necessidade de melhorar a qualidade na cadeia de produção dos vegetais minimamente processados para garantir a vida útil e a segurança microbiológica desses produtos.

Palavras-chave: Processo mínimo. Qualidade. Contaminação.

ABSTRACT

In Brazil, minimally processed collard greens is commercialized all year round and generally considered

*safe to eat by consumers. This study evaluated the microbiological quality of six different brands of minimally processed collard greens commercialized in supermarkets of Brasilia. The analyses carried out were: total counts of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total coliforms and thermotolerant coliforms and molecular identification of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* by DNA sequencing. The results revealed that samples of minimally processed collard greens presented poor microbiological quality. Thermotolerant coliforms were found in all samples of minimally processed collard greens, with populations higher than 2 log MPN.g⁻¹ in 50% of samples. After DNA sequencing, *E. coli* O157:H7 was identified in 2 of the 6 samples and *Salmonella enteritidis* was identified in 1 of 6 samples. *Listeria monocytogenes* was found in 50% of the samples and the presence of this bacterium is usually associated with an excessive period of storage*

or storage in abusive temperatures. These results showed that the minimally processed collard greens exposed to consumption in supermarkets of Brasilia may be a vehicle for the transmission of foodborne pathogens and indicated the need of implementing quality programs in the production chain of minimally processed vegetables to improve shelf life and microbiological safety of these products.

Keywords: *Minimally process. Quality. Contamination.*

INTRODUÇÃO

O hábito de consumir regularmente frutas e hortaliças tem evidente efeito benéfico na saúde humana. Esses alimentos possuem uma grande diversidade de compostos funcionais, como vitaminas, polifenóis, carotenoides, fitoquímicos e fibras alimentares. A Organização Mundial da Saúde recomenda a ingestão diária de 400 gramas de frutas e hortaliças frescas (WHO, 2003). A procura dos consumidores por uma dieta mais saudável associada à necessidade de praticidade no dia a dia causou uma expansão do mercado de vegetais minimamente processados (GURLER et al., 2015). Vegetais minimamente processados são frutas ou hortaliças modificadas fisicamente, porém com seu aspecto fresco mantido. As etapas do processamento mínimo de frutas ou vegetais incluem seleção, lavagem, corte, sanitização, centrifugação, embalagem e armazenamento refrigerado (TRESSELER et al., 2009).

Os vegetais minimamente processados são mais perecíveis dos que os vegetais *in natura*. Nas frutas e hortaliças intactas, a casca e a integridade do tecido vegetal constituem uma barreira ao acesso de

micro-organismos ao interior do produto. A injúria provocada nos tecidos vegetais em função do corte e da remoção da casca pode favorecer a contaminação por micro-organismos deterioradores e patogênicos. Na sanitização dos vegetais, o cloro é utilizado como agente antimicrobiano, sendo possível reduzir significativamente a população microbiana após esta etapa. No entanto, as operações de processamento mínimo não asseguram esterilidade ou estabilidade microbiológica. O manuseio dos vegetais favorece a contaminação por micro-organismos, enquanto a liberação de exsudados celulares disponibiliza nutrientes para a atividade microbiana (CENCI, 2011; MORETTI, 2007).

Sendo assim, os vegetais minimamente processados podem ser fonte de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e, segundo vários estudos, bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Vibrio cholerae* já foram relacionadas com surtos alimentares em razão do consumo de frutas e hortaliças contaminadas (CENCI, 2011; HERMAN; HALL; GOULD, 2015; LITTLE and GILLESPIE, 2008).

Dentre as hortaliças mais consumidas no Brasil, a couve (*Brassica oleracea* L.) é uma hortaliça arbustiva anual, que produz folhas que podem ser consumidas tanto cruas como cozidas. É grande a sua demanda em médios e grandes centros urbanos brasileiros. A couve pode ser conservada por vários dias sob a forma minimamente processada, desde que manuseada, embalada e refrigerada adequadamente (CENCI, 2011, TRESSELER et al., 2009). Folhas de couve minimamente processadas sem procedimentos rígidos de controle de qualidade apresentam rápida deterioração fisiológica e microbiológica, resultando em

tempo curto de vida de prateleira. O armazenamento da couve minimamente processada em condições adequadas de temperatura é essencial para a manutenção da qualidade do produto final. A temperatura de 5°C apresenta a melhor relação custo-benefício para a couve (CENCI, 2011; MORETTI, 2007).

A couve minimamente processada normalmente é distribuída e comercializada em pacotes de 100 a 300 gramas, dispostos em baldes refrigerados. A sua comercialização em gôndolas abertas, cujas temperaturas possam atingir 10°C, reduz a vida útil do produto, limitando o tempo de comercialização e favorecendo considerável crescimento microbiano, o que aumenta as possibilidades de riscos de doença alimentar, por causa do crescimento de bactérias patogênicas nessas condições (CENCI, 2011; MORETTI, 2007). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de diferentes marcas de couve minimamente processada comercializadas em supermercados de Brasília, Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises foram coletadas seis embalagens contendo 100-250g de couve minimamente processada, todas de diferentes marcas e em diferentes supermercados da cidade de Brasília, no período de janeiro a julho de 2015. Todas as amostras estavam em sua embalagem original e dentro do prazo de validade (seis a oito dias de validade como declarado no rótulo). As amostras foram imediatamente transportadas dos supermercados para o laboratório em uma caixa térmica refrigerada e as análises microbiológicas iniciaram-se no prazo máximo de uma hora após a coleta. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas

três alíquotas da cada embalagem e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

Para o preparo das amostras, foram pesadas 25g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (acima de 10^{-5}). As análises microbiológicas foram realizadas conforme descrito por *American Public Health Association* (APHA, 2001) e incluíram contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, determinação de coliformes totais e termotolerantes e pesquisa de *Salmonella* sp., *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Análises moleculares

As bactérias *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella* spp. foram identificadas por meio de análises moleculares, com sequenciamento de DNA. Para a extração do DNA, foi utilizado o kit NucleoSpin Plasmid®, seguindo as instruções do fabricante. Para a identificação das espécies de bactérias, as amostras foram sequenciadas utilizando o sequenciador de DNA automatizado Perkin Elmer ABI-Modelo 377. A mistura reacional consistiu em 200 ng de DNA, 5 nmol de nucleotídeos

adequados para cada amostra e o kit comercial DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing (MJ Research, INC). As sequências foram analisadas com o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e as sequências genômicas completas foram baixadas do banco de dados Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/micr.html>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabelece valores limites para a contagem total de micro-organismos (bactérias mesófilas, psicrotróficas e coliformes totais) em vegetais frescos. As análises de micro-organismos totais são muito utilizadas como indicadores de qualidade microbiológica geral dos alimentos (ICMSF, 2002). Pelos padrões estabelecidos pelo ICMSF (2002), permite-se uma contagem máxima de 7,0 log UFC/g de micro-organismos totais nos alimentos. Após sanitização dos vegetais é esperada uma redução da carga microbiana para, pelo menos, 5 log UFC/g (ICMSF, 2002).

No presente estudo, todas as amostras apresentaram alta contagem de bactérias mesófilas e/ou psicrotróficas, acima de 6,0 log UFC/g (6,2-7,8 log UFC/g), sendo

que somente a amostra 3 apresentou contagem menor que 7 log UFC/g (Tabela 1). Os vegetais minimamente processados devem ser armazenados em temperaturas adequadas de refrigeração a fim de retardar o crescimento de bactérias psicrotróficas (CENCI, 2011; MORETTI, 2007). Os micro-organismos psicrotróficos em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira dos alimentos refrigerados, por constituírem seus principais deterioradores (APHA, 2001). O tempo prolongado de armazenamento também favorece o crescimento da população microbiana. No trabalho realizado por Allende; Aguayo; Artés (2004), os produtos minimamente processados apresentaram um aumento de 5,0 para 8,0 log UFC/g na população microbiana, após sete dias de estocagem na temperatura de 5°C.

Segundo Maffei; Silveira; Cattanazi (2013), os vegetais frescos apresentam uma alta quantidade de coliformes totais como microbiota inicial vinda do solo, contudo é esperado que essa quantidade seja reduzida após o processo de sanitização. A maioria das amostras deste estudo teve elevada enumeração de coliformes totais (>3 log NMP/g). Resultados similares foram reportados por Oliveira et al. (2011) e Silva et al. (2007), sendo que a maioria

Tabela 1 - Análises microbiológicas das amostras de couve minimamente processada.

Amostras	Bactérias mesófilas (log UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (log UFC/g)	Coliformes totais (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)
1	7,1 ± 0,13	7,8 ± 0,07	3,0 ± 0,01	0,9 ± 0,07
2	7,1 ± 0,22	7,2 ± 0,29	3,0 ± 0,01	2,2 ± 0,01
3	6,8 ± 0,25	6,2 ± 0,44	3,0 ± 0,01	2,1 ± 0,60
4	6,8 ± 0,33	7,2 ± 0,06	1,5 ± 0,09	0,5 ± 0,01
5	7,3 ± 0,68	7,8 ± 0,09	3,0 ± 0,01	1,8 ± 0,17
6	7,1 ± 0,09	6,6 ± 0,06	3,0 ± 0,01	3,0 ± 0,01

Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições.

Tabela 2 - Ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas nas amostras de couve minimamente processada.

Amostras de couve	Bactérias identificadas
1	<i>Listeria monocytogenes</i>
2	<i>Listeria monocytogenes</i>
3	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>E. coli</i> O157:H7
5	<i>Listeria monocytogenes</i>
6	<i>E. coli</i> O157:H7

das amostras de vegetais minimamente processados comercializados nos supermercados de Ribeirão Preto e Porto Alegre apresentaram altos valores de coliformes totais (>3 log NMP/g).

No Brasil, o valor máximo permitido para coliformes termotolerantes é de 2,0 log NMP/g para hortaliças frescas, preparadas ou sanificadas para consumo direto (BRASIL, 2001). Neste estudo metade das amostras analisadas (amostras 2, 3 e 6) estava imprópria para o consumo, com excesso de coliformes termotolerantes. Os coliformes termotolerantes em excesso indicam falta de condições higienicossanitárias adequadas, pois estão associados com contaminação fecal dos alimentos e possível contaminação com patógenos entéricos (SILVA et al., 2007). Oliveira et al. (2011) reportaram que nas análises de vegetais minimamente processados comercializados nos supermercados da cidade de Ribeirão Preto, 45,6% das amostras, ou seja, 74 amostras de um total de 162 estavam com enumeração de coliformes termotolerantes acima do permitido.

Na amostra 3, que já estava imprópria para o consumo pelo excesso de coliformes termotolerantes, após o sequenciamento de DNA, foi detectada a presença de dois importantes patógenos entéricos nas doenças de origem alimentar: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*Salmonella enteritidis*) e *E. coli* O157:H7 (Tabela 2). A amostra 6

também apresentou a bactéria patogênica *E. coli* O157:H7.

As prováveis fontes de contaminação por bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. geralmente estão relacionadas com as práticas agrícolas inadequadas, como por exemplo, a utilização de águas poluídas e esterco animal não compostado (WOOD et al., 2010). A contaminação por esses patógenos pode se dar também nas etapas do processamento, porém a contaminação pré-colheita é mais preocupante, pois os patógenos podem se internalizar nos tecidos das plantas e se protegerem de sanitizantes utilizados na etapa pós-colheita (O'BEIRNE et al., 2014).

Alguns estudos têm demonstrado que *E. coli* e *Salmonella* spp. têm sido associadas a surtos de DTA em razão do consumo de vegetais. Em 2005, um grande surto de *E. coli* O157:H7 ocorreu na Suécia associado ao consumo de alface. Um total de 135 casos foi registrado, incluindo 11 casos de síndrome urêmica hemolítica (SODERSTROM et al., 2008). De acordo com Herman; Hall; Gould (2015), entre 1973 e 2012 nos EUA, 606 casos de DTA foram associados ao consumo de vegetais. As bactérias patogênicas que mais causaram esses surtos foram *E. coli* produtora de toxina Shiga (como *E. coli* O157:H7) e *Salmonella*.

Verificou-se a presença de *L. monocytogenes* em metade das amostras de couve analisadas (amostras

1, 2 e 5). *L. monocytogenes* é uma bactéria psicrotrófica que causa listeriose, uma doença com alta taxa de mortalidade em indivíduos susceptíveis, como mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pessoas imunodeprimidas. A infecção causada por *L. monocytogenes* parece estar relacionada com a ingestão de altas quantidades desse patógeno em indivíduos saudáveis (>8 log UFC) ou de baixas quantidades em indivíduos susceptíveis (2–3 log UFC) (SANT'ANA et al., 2012).

A presença de *L. monocytogenes* em vegetais geralmente está associada com um período excessivo de estocagem ou estocagem em temperaturas abusivas. Sant'Ana et al. (2012) estudaram o potencial de crescimento de *L. monocytogenes* em vegetais minimamente processados em condições de abuso de temperatura (15°C) pelo período de estocagem de seis dias. Nessas condições, após os seis dias, observou-se um aumento da população de *L. monocytogenes* acima de 2 log UFC nas amostras de agrião, rúcula e couve. Ainda, de acordo com Sant'Ana et al. (2012), embora os vegetais frescos tenham sido listados como alimentos de baixo risco de causar listeriose, o fato desse patógeno ser psicrotrófico não deveria ser subestimado em produtos minimamente processados, especialmente quando os vegetais não são estocados em temperaturas adequadas de refrigeração e

não são rapidamente consumidos, fornecendo um meio nutricional favorável ao desenvolvimento deste patógeno.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a maioria das amostras de couve minimamente processada apresentou qualidade microbiológica insatisfatória. Segundo a legislação brasileira, metade das amostras estava imprópria para o consumo pelo excesso de coliformes termotolerantes. Em duas amostras, após as análises moleculares, foram detectados os patógenos entéricos *Salmonella enteritidis* e *E. coli* O157:H7. E também metade das amostras apresentou a bactéria patogênica *L. monocytogenes*, que se multiplica nos alimentos refrigerados quando ocorre abuso da cadeia do frio. Assim, a couve minimamente processada exposta ao consumo em supermercados de Brasília está sendo distribuída com falta de qualidade microbiológica e existe a necessidade de adoção de melhores práticas higienicossanitárias pela indústria de processamento e pelos supermercados para minimizar os riscos de transmissão de patógenos.

REFERÊNCIAS

- ALLENDE, A; AGUAYO, E; ARTÉS, F. Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.91, p.109-117, 2004.
- APHA, American Public Health Association. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 676p, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n.º 12** de 02 de janeiro de 2001, Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF, 2001.
- CENCI, SA. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças: tecnologia, qualidade e sistemas de embalagem**, Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. 144 p.
- GURLER, Z; PAMUK, S; YILDIRIM, Y; ERTAS, N. The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: A focus on *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.196, p.79-83, 2015.
- HERMAN, KM; HALL, AJ; GOULD, LH. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. **Epidemiology and Infection**, v.143, n.14, p.3011-3021, 2015.
- ICMSF, Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, 2002.
- LITTLE, CL; GILLESPIE, IA. Prepared salads and public health. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1729-1743, 2008.
- MAFFEI, DF; SILVEIRA, NFA; CATANOZI, MPLM. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. **Food Control**, v.29, p.226-230, 2013.
- MORETTI, CL. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**, Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 531 p.
- O'BEIRNE D; GLEESON E; AUTY M; JORDAN K. Effects of processing and storage variables on penetration and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut packaged carrots. **Food Control**, v.40, p.71-77, 2014.
- OLIVEIRA, MA et al. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v.22, p.1400-1403, 2011.
- SANT'ANA, AS; BARBOSA, MS; DESTRO, MT; LANDGRAF, M; FRANCO, BDGM. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.52-58, 2012.
- SILVA, SRP et al. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.594-598, 2007.
- SODERSTROM, A; OSTERBERG, P; LINGQUIST, A; JOHNSON, B; LINBERG, A et al. A larger *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. **Foodborne Pathogenic Diseases**, v.5, p.339-349, 2008.
- TRESSELER, JK; FIGUEIREDO, EAT; MACHADO, TF; DEFINO, CM; SOUSA, PHM. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. **Ciênc e Agrotecnol**, v.33, p.1722-1727, 2009.
- WHO. World Health Organization. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Report Series 916. 2003. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO_TRS_916.pdf. Acessado em: 12 de dezembro de 2016.
- WOOD, JD; BEZANSON, GS; GORDON, RJ; JAMIESON, R. Population dynamics of *Escherichia coli* inoculated by irrigation into the phyllosphere of spinach grown under commercial production conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.198-204, 2010.