

Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializadas no Estado de Minas Gerais.

Microbiological evaluation of soft drink samples marketed in the state of Minas Gerais

Vanessa A. D. MORAIS^{1*}
Jovita E. G. C. MADEIRA¹
Edilânia C. DIAS²
Ana Carla BONCOMPAGNI²
Rúbia C. P. GONÇALVES²
Eunice de CARVALHO³

RIALA6/930

Morais, V. A. D. et al. - Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializadas no Estado de Minas Gerais. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 1 - 4 ,2003

RESUMO. Com o objetivo de avaliar as condições higiênicas dos refrigerantes, foram analisadas 100 amostras de diferentes marcas, nos sabores de cola, guaraná e frutas. As amostras, em embalagens Pet 2 litros, foram coletadas aleatoriamente no período de março a novembro de 2000, em estabelecimentos comerciais, pela Vigilância Sanitária do Estado (VISA/MG). Foram utilizadas duas metodologias distintas para enumeração de fungos viáveis em bebidas e Número Mais Provável para bactérias do grupo Coliforme (APHA, 1992). A primeira técnica utilizada para enumeração de fungos foi a do espalhamento em superfície, em placas contendo o meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), e a segunda, a técnica de membrana filtrante, empregando dois meios: M-Green Yeast and Mold e o meio DRBC. 13% das amostras foram condenadas como produtos em condições higiênicas insatisfatórias por apresentarem contagens de bolores e leveduras superiores à 20UFC/mL (Portaria 451/97 do MS/SVS – item XII, inciso a). Destas, 46,2% apresentaram leveduras, 30,8% leveduras e fungos filamentosos, e 23% fungos filamentosos. Não foram detectadas bactérias do grupo coliforme (ausência em 50 mL da amostra). Das amostras condenadas, 92,3% eram provenientes de indústrias classificadas como ruins ou precárias de acordo com suas instalações.

PALAVRAS-CHAVE. Refrigerantes; bolores; leveduras e coliformes

¹Fundação Ezequiel Dias – Núcleo de Micologia e Micotoxinas – IOM

²Bolsista do CNPq – Núcleo de Micologia e Micotoxinas - IOM

³Fundação Ezequiel Dias Laboratório de Microbiologia – IOM

*Endereço para correspondência: Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira, Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP: 36510-010 – Tel 0 XX (31) 33719462. Fax 0 XX (31) 33719553 - e-mail: vam@funed.mg.gov.br

APOIO FINANCEIRO: Ministerio da Saúde/ANVISA.

INTRODUÇÃO

Refrigerantes são bebidas não alcoólicas, consumidas mundialmente por milhões de pessoas, produzidas com água, açúcar, suco natural ou extrato vegetal, corante, acidulante, antioxidante, aromatizante, conservador e gás carbônico.

Considerados alimentos de alta atividade de água ($a_w > 0,90$) e alta acidez ($\text{pH} < 3,7$) os refrigerantes são passíveis de contaminação por bolores (fungos filamentosos), leveduras (fungos unicelulares)⁸ e coliformes⁷.

Os fungos constituem um grande e diversificado grupo de microrganismos composto por milhares de espécies que podem ser detectadas no solo, ar, água e alimentos. Eles são organismos eucariotas, aclorofilados, heterotróficos, com reprodução sexuada e assexuada, capazes de utilizar uma grande variedade de substratos como fontes de carbono, nitrogênio e energia¹³.

A enumeração de fungos viáveis, em bebidas, usualmente é feita pela técnica de espalhamento em superfície⁶. No caso de água potável, bebidas e similares recomenda-se também a técnica de membrana filtrante⁶.

O grupo dos coliformes totais inclui cerca de 20 espécies e é constituído por bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás⁷.

A enumeração de coliformes totais viáveis em bebidas usualmente é feita pela técnica de Número Mais Provável (NMP)⁷.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença dos fungos e coliformes totais em amostras de refrigerantes de diferentes marcas e sabores, envasadas em embalagens flexíveis (Pet/2litros) e comercializadas no Estado de Minas Gerais. Os padrões microbiológicos foram verificados segundo a Portaria 451/97 do MS/SVS - item XII inciso a¹. Esta Portaria estabelecia os limites de 20 unidades formadoras de colônias (UFC) de bolores e leveduras por mL da amostra e ausência de coliformes totais em 50mL da amostra. Entretanto, a partir de 2 de janeiro de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária adotou a Resolução nº12² que aboliu a contagem de bolores e leveduras das análises deste alimento, deixando o controle higiênico a cargo das indústrias.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem

As 100 amostras de refrigerantes foram coletadas aleatoriamente, em estabelecimentos comerciais do interior e da capital do Estado de Minas Gerais/Brasil, pela Vigilância Sanitária (VISA/MG), no período de março a novembro de 2000. Destas, 46% possuíam sabor de frutas (abacate, abacaxi, framboesa, laranja, limão, maçã, mexerica, morango, tangerina

e uva), 43% de guaraná e 11% de cola. As análises foram efetuadas em três repetições.

As indústrias produtoras de refrigerantes foram classificadas, como: A= boa, B= regular, C= ruim, D= precária. Esta classificação foi feita de acordo com os aspectos gerais de suas instalações, qualidade da água e da matéria prima, área de manipulação, equipamentos e utensílios. As visitas às indústrias foram realizadas no decorrer do estudo.

2. Metodologia

2.1 Contagem de bolores e leveduras após plaqueamento

Alíquotas de 0,3mL, 0,3mL, 0,3mL e 0,1mL da amostra não diluída foram pipetadas, distribuídas e espalhadas na superfície de placas contendo o meio Dicloran Rosa de Bengala (DRBC/DIFCO)⁴, perfazendo 1mL da amostra, em duplicatas. As placas foram incubadas, sem inverter a posição, por 5 dias à 25°C.

2.2 Contagem de bolores e leveduras após filtração em membranas

Alíquotas de 5mL foram filtradas utilizando-se o Sistema Microfil da Millipore composto de: Manifold em aço inox 308, copos descartáveis de polipropileno e membranas de poro 0,80µm, específica para fungos. Este conjunto de filtração foi ligado a uma bomba de vácuo.

Foram utilizadas placas de Petri estéreis e descartáveis de 47mm em poliestireno, contendo o meio DRBC (DIFCO)¹² e M-Green Yeast and Mold Broth com adição de ágar (BBL)⁹. As placas foram incubadas, sem inverter a posição, por 5 dias à 25°C.

2.3 Isolamento, Enumeração e Identificação dos fungos

Cada colônia de fungos foi contada, isolada e identificada de acordo com Samson et al (1996)¹⁰ e Pitt & Hocking (1999)⁸.

As colônias de leveduras foram identificadas pela taxonomia clássica⁸ e também com kits Mini Api ID 32D (BioMérieux).

2.4 Número Mais Provável (NMP) de coliformes⁷

Teste presuntivo: Alíquotas de 10 mL foram inoculadas em 5 tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) concentração dupla, com tubos de Durhan. O pH das amostras foi neutralizado sempre que necessário usando-se NaOH 0,1N. Os tubos foram incubados à 35°C por 24 – 48 horas.

Teste confirmativo: Os tubos que apresentaram gás foram repicados para Caldo Verde Brilhante Bile (VB) concentração simples, com tubos de Durhan. Os tubos foram incubados à 35°C por 48 horas.

A reação foi considerada positiva quando ocorreu a presença de bolhas no interior dos tubos de Durhan.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram detectadas bactérias do grupo coliforme (ausência em 50 mL da amostra) em todas as amostras de refrigerantes analisadas. Destas, 13% foram condenadas por apresentarem contagens de bolores e leveduras superiores a 20 UFC/mL (Portaria 451/97 do MS/SVS - ítem XII inciso a)¹.

Foram analisadas 46 amostras de refrigerantes de frutas, 43 de guaraná e 11 de cola. De um total de 13 amostras condenadas, 6 (46,2%) foram de guaraná e 7 (53,8%) de frutas.

Das amostras condenadas 7,7% foram produzidas em indústrias consideradas regulares, 69,2% ruins e 23,1% precárias.

Em relação às duas metodologias utilizadas para enumeração de bolores e leveduras observou-se que o percentual de condenação das 100 amostras analisadas foi igual quando se utilizou os meios DRBC (técnica do espalhamento em superfície) e M-Green Yeast and Mold (técnica de filtração em membrana). Entretanto, neste trabalho o meio DRBC apresentou menores populações em relação ao meio M-Green Yeast and Mold, quando foi utilizada a técnica de filtração em membrana.

Este método é utilizado em análises de rotina pelas grandes indústrias de bebidas e permite a detecção de pequeno número de microrganismos, por concentração da amostra⁵.

Taniwaki et al. (1999)¹³ observaram que as populações obtidas com o meio DRBC utilizando-se a técnica do espalhamento em superfície foram maiores quando comparadas com as populações encontradas em outros meios tais como Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG 18), Ágar Batata Dextrose Acidificado (APDA), Ágar Batata Dextrose Antibióticos (PDAA), Ágar Sabouraud Dextrose Antibióticos (SDAA), Ágar Extrato de Malte Antibióticos (MEAA) e Petrifilm YM. Esta técnica propicia a maior exposição das células ao oxigênio atmosférico e evita o estresse das mesmas pelo ágar liqüefeito após aquecimento.

As indústrias de refrigerantes vêm utilizando o meio M-Green Yeast and Mold Broth com a técnica de membrana filtrante para detecção de fungos em bebidas contendo açúcar, xaropes, frutas cítricas, carbonatadas⁹.

As amostras que apresentaram condições higiênicas insatisfatórias, com base na Portaria nº 451/97 da Vigilância Sanitária, foram condenadas. Destas, 46,2% apresentaram leveduras, 30,8% leveduras e fungos filamentosos, e 23% fungos filamentosos. Estes resultados estão de acordo com Pitt & Hocking (1999)⁸ que afirmam que as leveduras são deteriorantes associados a alimentos ácidos líquidos engarrafados, com disponibilidade de oxigênio reduzida e diferentes concentrações de CO₂, no interior dos quais os microrganismos unicelulares se dispersam mais facilmente.

As leveduras mais encontradas foram *Zygosacharomyces rouxii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, e *Criptococcus albidus*. A presença de *Zygosacharomyces rouxii* dentre as leveduras

isoladas é pertinente pois ela é considerada uma levedura osmofílica e está frequentemente associada à deterioração de alimentos processados. É essencial a manutenção de um rigoroso programa de limpeza e sanitização da linha de produção de bebidas porque esta levedura pode desenvolver continuamente nos equipamentos e sua presença no produto só será detectada depois de um período considerável de tempo (Pitt & Hocking, 1999)⁸.

Os bolores mais encontrados foram *Cladosporium sp.*, *Curvularia sp.*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *Penicillium commune*, *P. decumbens*, *P. citrinum* e *P. glabrum*. A presença do fungo xerofílico *Eurotium amstelodami* também foi observada. O *Penicillium commune* possui habilidade para crescer em atmosferas com baixa concentração de O₂, alta concentração de CO₂ ou ambos. Este fungo é capaz de produzir, em diversos substratos, várias micotoxinas incluindo ácido ciclopiazônico, ácido ciclopaldico e rugulovasinas^{3,11}.

A presença de micélio visível, substância estranha à constituição normal dos refrigerantes, independente de ser passível de germinação ou multiplicação, já pode se constituir uma razão para a rejeição destes produtos. A constatação dos fungos em alimentos é indicativa de má qualidade da matéria prima ou falhas higiênicas ao longo do processamento. É importante salientar que alguns bolores e leveduras provenientes de alimentos podem causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos e reações alérgicas em indivíduos saudáveis⁶.

CONCLUSÃO

A partir de 2 de janeiro de 2001 passou a vigorar a resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)² que excluiu o parâmetro contagem de bolores e leveduras (20 UFC/mL) das análises de refrigerantes. Entretanto, o parâmetro coliformes à 35°C/50 mL (Ausência) permanece. A presença de coliformes totais, bolores e leveduras em número superior àqueles estabelecidos pela Portaria 451/97 em alimentos destinados ao consumo humano, evidencia práticas de higiene aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos¹. Tendo em vista que não foi detectada a presença de coliformes e sim de bolores e leveduras, a retirada deste último parâmetro da legislação dificulta o monitoramento das indústrias de refrigerantes pelos órgãos de fiscalização, impedindo assim uma ação efetiva por parte das Vigilâncias Sanitárias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério da Saúde e ao CNPq pelo auxílio financeiro, ao Dr Carlos Rosa (ICB/UFMG) pelo apoio técnico na classificação das leveduras e à BioMérieux pelo fornecimento dos kits Mini Api ID 32C.

Morais, V. A. D. et al. - Microbiological evaluation of soft drink samples marketed in the state of Minas Gerais. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 1 - 4, 2003.

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the hygienic and sanitary quality of soft drinks of different commercial brands, flavours cola, guaraná and fruits. The samples (2 liters Pet) were randomly collected in commercial establishments by the Inspection Service (VISA/MG). Two methodologies were used to enumerate viable fungi in beverages (APHA, 1992). The first one was the surface spread-plate technique using Dicloran Rose Bengal Chloranphenicol medium, and the second one was the membrane filter technique, and media: M-Green Yeast and Mold and DRBC medium . 13% of the soft drink samples showed levels of yeast and mold higher than 20 CFU/mL being classified as unacceptable because of its hygienic conditions (Portaria 451/97 of MS/SVS – item XII-a). 46.2% of these samples presented yeasts, 30% yeasts and molds, and 23% molds. Coliforms were not detected in the samples. 92.3% of the unacceptable samples were provenient from industries classified as bad or precarious according to their premises.

KEY WORDS: Soft drinks, Yeast, Mold and Coliforms

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997 da Vigilância Sanitária – Diário Oficial da União, Brasília. nº 182 – Seção 1, p. 21005-21012, de 22 de setembro de 1997.
2. Brasil. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 - Diário Oficial da União, Brasília. Seção 1, p. 45 – 53, de 10 de janeiro de 2001. [Agência Nacional de Vigilância Sanitária].
3. Frisvad, J. C. Fungal species and their production of mycotoxins. In: Samson, R. A., editor. **Introduction to Food-borne Fungi**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1988. p. 239-49.
4. King, A. D., Hocking, A. D., Pitt, J. I. Dichloran-Rose Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, 37: 959-64, 1979.
5. Koburger, J. A. & Norden, A. R. Fungi in Foods. **J. Milk Food Technol.**, 38: 745-6, 1975.
6. Mislivec, P. B.; Beuchat, L. R.; Cousin, M. A. Yeasts and Molds. In: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F., editor. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed. Washington: APHA; 1992. p. 239 – 49.
7. Peeler, J. I.; Houghtby, G. A.; Raimoser, A. P. The Most Probable Number Technique. In: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F., editor. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed. Washington: APHA; 1992. p. 105 – 20.
8. Pitt, J. I. & Hocking, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2.ed. Maryland: Aspen Publishers Inc.; 1999. 593 p.
9. Power, D. A. & McCuen, P. J. Manual of BBL Products and Laboratory Procedures. 6.ed. Becton Dickinson Microbiology Systems, 1988.
10. Samson, R. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., King, A. D. **Modern Methods in Food Mycology**. Amsterdam: Elsevier; 1992. 388 p.
11. Scussel, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular; 1998. 144p.
12. Silva, N., Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Sucos e Refrigerantes**. São Paulo: ITAL; 1997. 154p.
13. Taniwaki, M. H., Iamanaka, B. T., Banhe, A. A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. **J. Food Mycol.**, 2: 291-302, 1999. Recebido em 02/01/2002; Aprovado em 13