

Identificação e avaliação da resistência antimicrobiana de leveduras em vegetais minimamente processados

Identification and evaluation of antimicrobial resistance of yeast in minimally processed vegetables

RIALA6/1355

Ana Paula Maciel PEREIRA*, Catherine Hirsch WERLE, Tânia Maria Vinturim GONÇALVES, Fernando Leite HOFFMANN

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Imperial, nº. 66, apto 501, bairro Vila Imperial, São José do Rio Preto/SP, Brasil. CEP 15015-610. Tel.: 34 3822-1738. E-mail: anapaula@sjrp.unesp.br.

Recebido: 23.02.2010 – Aceito para publicação: 30.06.2011

RESUMO

O consumo de vegetais minimamente processados vem crescendo devido às exigências dos consumidores por produtos de fácil preparo. Este produto, por ser extremamente manipulado, pode ser contaminado por micro-organismos deteriorantes, como as leveduras, que possuem a capacidade de diminuir a vida útil do alimento. Neste sentido, visando à preocupação com a resistência de micro-organismos aos métodos de sanitização utilizados pelas indústrias de alimentos e diante da necessidade de maiores estudos do poder antimicrobiano do ozônio, este estudo teve por objetivo isolar e identificar as leveduras presentes nos vegetais minimamente processados e verificar sua resistência antimicrobiana frente ao hipoclorito de sódio e ozônio. Foram coletadas 84 amostras de vegetais minimamente processados. Destas, foram isoladas 47 culturas de leveduras que foram submetidas à identificação e ao ensaio de resistência ao hipoclorito de sódio (50, 100, 200 e 400 ppm) e ozônio (0,25 e 0,5 ppm). Do total de leveduras isoladas, 85,1% corresponderam à *Cryptococcus laurentii*, 12,8% à *Arxula adenivorans* e 2,1% à *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. Todas elas apresentaram resistência aos sanitizantes hipoclorito de sódio e ozônio em todas as concentrações testadas. Diante destas observações, medidas devem ser adotadas durante o processamento para evitar a contaminação por microbiota deteriorante.

Palavras-chave. vegetais minimamente processados, leveduras, hipoclorito de sódio, ozônio.

ABSTRACT

The consumption of minimally processed vegetables has been growing due to consumer demand for products easy to prepare. As it is extremely manipulated, this product can be contaminated with spoilage organisms such as yeasts, that have the ability to decrease the shelf life of food. In this sense, seeking to concerns about the resistance of microorganisms to sanitation methods for food industries and given the need for more studies of the antimicrobial power of ozone, this study aimed to isolate and identify the yeasts present in minimally processed vegetables, and check their antimicrobial resistance to sodium hypochlorite and ozone. 84 samples of minimally processed vegetables were collected. From them, 47 yeast cultures were isolated and submitted for identification and testing of resistance to sodium hypochlorite sanitizers (50, 100, 200 and 400 ppm) and ozone (0.25 and 0.5 ppm). From the total yeast isolated, 85.1% corresponds to *Cryptococcus laurentii*, 12.8% to *Arxula adenivorans* and 2.1% to *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. All of them were resistant to the sanitizers sodium hypochlorite and ozone at all concentrations tested. Given these observations, some actions must be taken during processing to avoid contamination with deteriorative microbiota.

Keywords. minimally processed vegetables, yeast, sodium hypochlorite, ozone.

INTRODUÇÃO

Os vegetais minimamente processados são produtos *in natura*, selecionados, lavados, descascados, cortados, sanitizados, embalados e refrigerados, tornando-se prontos para o preparo e/ou consumo. Surgiram há aproximadamente 30 anos nos Estados Unidos da América (EUA) e, no Brasil, tal tecnologia foi introduzida somente na década de 1990, devido ao crescimento da demanda de produtos considerados de conveniência ou de preparo rápido¹.

Fantuzzi et al.² e Paula et al.³ relataram que, para assegurar a saúde do consumidor, tais produtos devem apresentar boa qualidade microbiológica, que depende da carga microbiana presente na matéria-prima, condições em que cada etapa do processamento foi efetuada até o armazenamento do produto.

Os fungos filamentosos e as leveduras são indicadores de eficiência do processo de sanitização de equipamentos e utensílios durante o processamento de alimentos, pois esses micro-organismos são considerados agentes potenciais de deterioração, com poder de oxidação de diferentes substratos, como os carboidratos⁴.

Bolores e leveduras são micro-organismos provenientes do solo e/ou do ar, resistentes a condições adversas, como pH ácido, baixa atividade de água e temperatura ótima na faixa de 25 a 28 °C, fazendo com que não se desenvolvam em temperaturas de refrigeração^{5,6}.

A água utilizada na lavagem dos vegetais é de grande importância para a garantia de segurança dos alimentos e a adição de antimicrobianos poderia melhorar sua eficiência, reduzindo o risco de desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos^{1,7}.

Desta forma, o processamento mínimo objetiva oferecer ao consumidor produtos práticos, semelhantes aos frescos e com vida útil relativamente prolongada, mantendo sua qualidade nutritiva e ainda proporcionando inocuidade do ponto de vista microbiológico³.

Dentre algumas soluções desinfetantes, a mais utilizada é o cloro, em suas várias formas. O hipoclorito de sódio é o sanitizante mais empregado devido a sua rápida ação, fácil aplicação e completa dissociação em água, porém em elevadas concentrações pode ocasionar descoloração em alguns produtos^{8,9}.

O gás ozônio é um antimicrobiano pouco utilizado no Brasil, embora seja eficiente e considerado mais seguro do que os demais sanitizantes comumente utilizados pela

indústria de alimentos. Por esta razão, produtores de vegetais minimamente processados vêm substituindo o hipoclorito de sódio por tal sanitizante¹⁰.

Conforme Lanita e Silva¹¹, o ozônio vem ganhando destaque por ser mais seguro do que os desinfetantes mais comuns, pois não deixa resíduos tóxicos capazes de alterar características como sabor e odor. Dentre suas diversas aplicações destaca-se a desinfecção de equipamentos e embalagens, além de evitar a formação de biofilmes microbianos.

As concentrações de hipoclorito de sódio recomendadas pela legislação na higienização de alimentos variam de 100 a 250 ppm¹². Para o ozônio não existe até o momento uma legislação específica para seu uso em alimentos¹³.

Neste contexto, visando à preocupação com a resistência de micro-organismos aos métodos de sanitização utilizados pelas indústrias de alimentos e diante da necessidade de maiores estudos do poder antimicrobiano do ozônio, este estudo teve por objetivo isolar e identificar as leveduras presentes nos vegetais minimamente processados e verificar sua resistência antimicrobiana frente aos sanitizantes empregados no processamento, hipoclorito de sódio e ozônio.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, amostras de vegetais minimamente processados foram cedidas por uma microempresa localizada no município de São José do Rio Preto/SP e essas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Foram coletadas 12 amostras de acelga, cenoura, couve, milho e vagem e 06 amostras de abóbora, couve-flor, quiabo e repolho, totalizando 84 amostras. Destas, foram isoladas 47 culturas de leveduras.

As maiores porcentagens de positividade de isolamento foram obtidas nas amostras de milho, abóbora, couve-flor e cenoura, com 58,3%, 50%, 50% e 41,6% respectivamente, sendo que nas amostras de couve, quiabo e vagem foram observadas positividade de 33,3% e, nas amostras de acelga e repolho, de 16,6%.

Para o crescimento e isolamento das colônias de leveduras foi utilizado o método de semeadura por profundidade utilizando o Potato Dextrose Agar (PDA) acidificado com ácido tartárico a 10% (pH = 4). Em seguida, cada cultura pura foi previamente submetida

à coloração de Gram e observada sob microscopia óptica, recebendo um código de identificação, ou seja, VMP_cN onde VMP = vegetal minimamente processado, c = número da coleta e N = número da levedura isolada desta amostra, sendo mantida em meio “Gymp” coberto com óleo mineral para evitar ressecamento e mantida a 8 ± 2 °C para posterior identificação.

Nos testes taxonômicos (morfológicos e fisiológicos) foram empregados os métodos descritos por Kreeger Van Rij¹⁴ e Barnett et al.^{15,16}. A identificação das culturas foi realizada segundo chaves descritas por Barnett et al.¹⁶ e Kurtzman e Fell¹⁷.

No ensaio de resistência aos sanitizantes foi utilizado o ágar Sabouraud glicose, no qual foi acrescido o hipoclorito de sódio nas concentrações 50, 100, 200 e 400 ppm e o ozônio aquoso nas concentrações 0,25 e 0,5 ppm. Como controle foi empregado o mesmo meio de cultura, porém sem a adição do sanitizante.

As culturas de 24-48 horas em meio “Gymp” foram transferidas e pré-incubadas durante 3 a 5 dias a 25 °C em *Yeast Nitrogen Base* 0,67% líquido contendo 0,1% de glicose, sendo agitadas periodicamente para o consumo do endógeno. A partir daí, cada inóculo foi transferido assepticamente para um sistema *replica-plate multityped*, que permite a inoculação de vinte e cinco colônias/placa de Petri^{18,19}.

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 25 °C com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação.

A resistência antimicrobiana foi verificada de acordo com a presença de crescimento de cada levedura no meio de cultura acrescido com os sanitizantes nas concentrações testadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação das leveduras

As leveduras isoladas das amostras e identificadas estão apresentadas na Tabela 1 de acordo com a sua origem, sendo que os maiores percentuais corresponderam à cenoura, couve, milho e couve-flor, os quais apresentaram boa disponibilidade de nutrientes e umidade para o desenvolvimento de micro-organismos²⁰.

As culturas identificadas corresponderam às espécies *Arxula adenivorans*, *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (Tabela 2).

A espécie *Cryptococcus laurentii* foi a mais frequente, compreendendo 40 culturas (85,1%), seguida por *Arxula adenivorans* com 6 (12,8%) e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* com 1 (2,1%).

A espécie *Arxula adenivorans* fermenta a glicose, galactose, sucrose, maltose, lactose, rafinose e trealose e é proveniente de solos e de insetos. A *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* possui a capacidade de alterar o sabor do alimento e é comumente encontrada em alimentos ácidos¹⁷.

Cryptococcus laurentii é uma espécie não fermentativa, com capacidade de desenvolvimento em elevadas concentrações de ácido e sal¹⁷. Esta levedura apresenta cor esbranquiçada, vermelha ou laranja e pode ser encontrada em vegetais e solos, peixes marinhos, camarão e carne de gado crua moída²⁰.

Seixas²¹ ao isolar leveduras em saladas de maionese, verificou que 76% correspondiam à *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, 16% à *Cryptococcus laurentii*, 4% à *Arxula adenivorans* e 4% à *Candida edax*.

Tabela 1. Distribuição do total das leveduras isoladas de acordo com o vegetal de origem

Vegetais minimamente processados	Códigos das culturas (VMP _c N)*	Número de culturas	Porcentagens (n = 47)**
Acelga	A ₇ 1; A ₇ 2; A ₇ 3; A ₁₁ 1	04	8,5%
Cenoura	B ₇ 1; B ₈ 1; B ₈ 2; B ₉ 1; B ₉ 2; B ₁₁ 1; B ₁₁ 2; B ₁₂ 1; B ₁₂ 2	09	19,2%
Couve	C ₇ 1; C ₇ 2; C ₇ 3; C ₈ 1; C ₉ 1; C ₉ 2; C ₁₁ 1; C ₁₁ 2	08	17,0%
Milho	D ₅ 1; D ₆ 1; D ₇ 1; D ₈ 1; D ₉ 1; D ₉ 2; D ₁₁ 1; D ₁₂ 1	08	17,0%
Quiabo	E ₅ 1; E ₆ 1	02	4,3%
Repolho	F ₅ 1	01	2,1%
Vagem	G ₅ 1; G ₉ 1; G ₁₀ 1; G ₁₁ 1	04	8,5%
Couve-flor	H ₇ 1; H ₇ 2; H ₇ 3; H ₈ 1; H ₁₁ 1; H ₁₁ 2; H ₁₁ 3; H ₁₁ 4	08	17,0%

*VMP_cN: VMP = vegetal minimamente processado; C = número da coleta; N = número da levedura isolada

**n: número total de leveduras isoladas

Tabela 2. Frequência relativa das três espécies de leveduras isoladas

Leveduras	Código das culturas (VMP _C N)*	Número de culturas	Porcentagens (n = 47)**
<i>Arxula adenivorans</i>	B ₇ 1; B ₁₁ 2; D ₅ 1; D ₆ 1; D ₁₂ 1; I ₉ 1 A ₇ 1; A ₇ 2; A ₇ 3; A ₁₁ 1; B ₈ 1; B ₉ 1; B ₉ 2; B ₁₁ 1; B ₁₂ 1; B ₁₂ 2; C ₇ 1; C ₇ 2; C ₇ 3; C ₈ 1; C ₉ 1; C ₉ 2; C ₁₁ 1; C ₁₁ 2;	06	12,8%
<i>Cryptococcus laurentii</i>	D ₇ 1; D ₈ 1; D ₉ 1; D ₉ 2; D ₁₁ 1; E ₅ 1; E ₆ 1; F ₅ 1; G ₅ 1; G ₉ 1; G ₁₀ 1; G ₁₁ 1; H ₇ 1; H ₇ 2; H ₇ 3; H ₈ 1; H ₁₁ 1; H ₁₁ 2; H ₁₁ 3; H ₁₁ 4; I ₇ 1; I ₈ 1	40	85,1%
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	B ₈ 2	01	2,1%

*VMP_CN: VMP = vegetal minimamente processado; C = número da coleta; N = número da levedura isolada

**n: número total de leveduras isoladas

As hortaliças apresentaram uma elevada quantidade de água e nutrientes propiciando o desenvolvimento de micro-organismos, sendo que o *Cryptococcus* sp. é um dos gêneros de leveduras mais encontrados em hortaliças, juntamente com *Rhodotorula* sp., *Candida* sp. e *Kloeckera* sp.. A contaminação pode ocorrer por meio do solo, rico nesses micro-organismos, os quais podem chegar ao alimento pelo vento ou por insetos. A chuva pode arrastar a terra elevando a carga microbiana, além de aumentar a umidade e favorecer o crescimento de fungos em até 72%²².

Ensaio de resistência ao hipoclorito de sódio e ozônio

A microempresa utilizou o hipoclorito de sódio na concentração de 100 ppm no período em que foram realizadas as seis primeiras coletas. Posteriormente, foi instalado um gerador de ozônio no tanque de sanitização e este antimicrobiano passou a ser utilizado na concentração de 0,5 ppm. Desta forma, as leveduras isoladas foram submetidas às concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm de hipoclorito de sódio e 0,25 e 0,5 ppm de ozônio. É válido ressaltar que não foi possível realizar o teste com o dobro da concentração de ozônio, visto que o gerador se encontrava regulado apenas para a concentração de 0,5 ppm.

Todas as leveduras isoladas apresentaram resistência a todas as concentrações testadas de hipoclorito de sódio (50, 100, 200 e 400 ppm) e de ozônio (0,25 e 0,5 ppm). Esses resultados são insatisfatórios, mostrando que as concentrações utilizadas no processamento mínimo são ineficientes para diminuir ou eliminar tais micro-organismos.

Estudos realizados por Galetti et al.²³, ao testarem o perfil de resistência de micro-organismos isolados de manipuladores, superfícies de contato e alimentos, durante

o processo de produção de frango xadrez e alcatra ao molho, verificaram que o hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm não foi eficaz contra nenhuma das cepas testadas.

Pesquisas revelaram que o aumento da concentração de hipoclorito de sódio para 2000 ppm na desinfecção de melões “Cantaloupe” não provocou redução adicional na população de micro-organismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras durante 20 dias de armazenamento a 2,2 °C²⁴.

Em contrapartida, Both et al.²⁵ constataram que 200 ppm de hipoclorito de sódio foram eficientes para inativação microbiana, com tempo de contato não inferior a 30 minutos.

De acordo com Chiattonne et al.¹³ as concentrações de 0,5 e 1,0 ppm de ozônio são capazes de reduzir consideravelmente a carga microbiana na etapa de sanificação de carne bovina maturada. Já no tratamento de carcaças de frango, a água ozonizada foi eficiente nas concentrações de 3,0 e 3,5 ppm, reduzindo 58,6% de bolores e leveduras.

Cardoso et al.²⁶, ao avaliarem a ação do ozônio no tratamento de água, constataram que a concentração de 4 ppm foi capaz de diminuir grande parte da microbiota contaminante presente.

Por outro lado, Ponce et al.²⁷ verificaram redução significativa de bolores e leveduras em morangos minimamente processados sanitizados com ozônio na concentração de 50 ppm.

A ação germicida do ozônio variou de acordo com o tipo de micro-organismo, sendo mais efetiva contra células vegetativas de bactérias do que esporos ou fungos. Esse sanitizante também combate algumas

espécies de vírus, como o da hepatite A, influenza A, estomatite vesicular e rinotraqueíte²⁶.

Silva et al.²⁸ ressaltaram que é importante considerar o fato de que desinfetantes de marcas comerciais distintas podem apresentar diferenças na eficácia antimicrobiana, tornando necessário o monitoramento da qualidade dos produtos disponíveis no mercado, garantindo, assim, segurança na etapa de sanitização.

Os resultados encontrados permitem inferir que a resistência das leveduras aos sanitizantes é preocupante, pois tais micro-organismos podem deteriorar o alimento, diminuindo sua vida de prateleira. Devem ser adotadas medidas ao longo do processamento com o objetivo de prevenir a contaminação destes micro-organismos, como a aplicação de maiores concentrações de ozônio. Em relação ao hipoclorito de sódio, concentrações mais altas não são permitidas pela legislação, pois, além de oferecerem riscos à saúde humana, podem provocar alterações organolépticas nos alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Chitarra MIF. Processamento mínimo de frutos e hortaliças. Viçosa: Centro de Produções Técnicas; 1998.
2. Fantuzzi E, Puschmann R, Vanetti MCD. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. *Ciênc Tecnol Alim*. 2004;24(2):207-11.
3. Paula NRF, Boas EVBV, Rodrigues LJ, Carvalho RA, Piccoli RH. Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras-MG, Brasília-DF e São Paulo-SP. *Ciênc Agrotecnol*. 2009;33(1):219-27.
4. Brito CS, Rossi DA. Bolores e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja *in natura* e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia-MG. *Biosc J*. 2005;21(1):133-40.
5. Ferreira MGAB, Bayma AB, Martins AGLA, Garcias Júnior AV, Marinho SC. Aspectos higiênico-sanitários de legumes e verduras minimamente processados e congelados. *Hig Alim*. 2003;17(106):49-55.
6. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Varela; 2007.
7. Aguila JSD, Sasaki FF, Heiffig LS, Ongarelli MG, Gallo CR. Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. *Hortic Brasil*. 2006;24(1):75-8.
8. Srebernich SM. Utilização de dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. *Ciênc Tecnol Alim*. 2007;27(4):744-50.
9. Zacari CZ, Shirahigue LD, Gonçalves MFV, Gallo CR, Spoto MHF. Qualidade do repolho minimamente processado, submetido a diferentes concentrações de cloro. *Hig Alim*. 2007;21(155):67-71.
10. Paschoalato CFPR, Trimailovas MR, Bernardo L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica. *Eng Sanit Ambient*. 2008;13(3):313-22.
11. Lanita CS, Silva SB. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. *Braz J Food Technol*. 2008;11(3):182-9.
12. Brasil. Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo. Portaria 6/99, de 10 de março de 1999. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. *Diário Oficial [do] Estado de São Paulo*. São Paulo, SP, 12 mar. 1999.
13. Chiattonne PV, Torres LM, Zambiasi RC. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. *Alim Nutr*. 2008;19(3):341-9.
14. Kreger-van Rij NJW. The yeasts: a taxonomy study. Amsterdam: Science Publication; 1984.
15. Barnet JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press; 1983.
16. Barnet JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press; 1990.
17. Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts: a taxonomy study. Oxford: Elsevier; 1998.
18. Lederberg J, Lederberg EM. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol*. 1952;63:399-406.
19. Sheree Lin CC, Fung DYC, Cox NA. Conventional and rapid methods for yeasts identification. *Crit Rev Microbiol*. 1987;14(4):273-89.
20. Jay JM. Microbiologia dos alimentos. Porto Alegre: Artmed; 2005.
21. Seixas FRF. Verificação das boas práticas de fabricação (BPF) e análise da qualidade microbiológica de saladas adicionadas de maionese comercializadas na cidade de São José do Rio Preto-SP [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto(SP): Universidade Estadual Paulista; 2008.
22. Porte A, Maia LH. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. *Bol CEPPA*. 2001;19(1):105-18.
23. Galetti FCS, Azevedo AP, Azevedo RVP. Avaliação do perfil de sensibilidade a antissépticos, desinfetantes e antibióticos (resistograma), de bactérias isoladas de manipuladores, superfícies de contato e alimentos, durante o processo de produção de frango xadrez e alcatra ao molho. *Hig Alim*. 2005;19(129):91-9.
24. Ayhan Z, Chism GW, Richter ER. The shelf-life of minimally processed fresh cut melons. *J Food Qual*. 1998;21(1):29-40.
25. Both JMC, Longaray SM, Avancini CAM. O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente ao *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):254-8.
26. Cardoso CC, Veiga SMOM, Nascimento LC, Fiorini JE, Amaral LA. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. *Ciênc Tecnol Alim*. 2003;23(1):59-61.
27. Ponce AR, Bastiani MID, Minim VP, Vanetti MCD. Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. *Ciênc Tecnol Alim*. 2010;30(1):113-8.
28. Silva N, Silveira NFA, Yokoya F, Okazaki MM. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. *Ciênc Tecnol Alim*. 2003;23(2):167-73.