UNISA – UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ERICA YURI FUSANO

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CALDOS DE CANA COMERCIALIZADOS NA ZONA SUL DE SÃO PAULO

São Paulo
2014

ERICA YURI FUSANO

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CALDOS DE CANA COMERCIALIZADOS NA REGIÃO SUL DE SÃO PAULO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro, sob orientação da Profª. Renata Savarino Levenhagen

São Paulo

2014

ERICA YURI FUSANO

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CALDOS DE CANA COMERCIALIZADOS NA ZONA SUL DE SÃO PAULO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA sob orientação da Área de Concentração Ciências Biológicas

Data de Aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____

(nome do orientador e Titulação)

_____

(nome do professor e Titulação)

CONCEITO FINAL:_____

RESUMO

O caldo de cana, também conhecido como garapa, é uma bebida caracterizada como um líquido viscoso, opaco, de cor amarela esverdeada e comercializado por garapeiros em vias públicas, lanchonetes e feiras, por exemplo, sendo obtido através da extração de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Por apresentar forma de extração artesanal e alta atividade de água, temperatura e pH favoráveis da matéria-prima, o caldo pode ser uma alta fonte de contaminação. O presente estudo avaliou microbiologicamente a qualidade e as condições higiênico-sanitárias em 5 estabelecimentos que comercializam caldos de cana na zona Sul de São Paulo no período de agosto e setembro de 2012. Com a finalidade de verificar a presença de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., pode-se concluir que todas as amostras analisadas (100%) estavam impróprias para o consumo humano e que uma inspeção e treinamento técnico deveriam ser implementados nos estabelecimentos. As 5 amostras de caldo de cana in natura foram obtidas através da extração da cana-de-açúcar, e encaminhadas ao laboratório de Tecnologia e Inspeção Sanitária de Alimentos da Universidade de Santo Amaro (Unisa). Os resultados obtidos variaram de 1,1 x 10^2 a 1,1 x 10^3 coliformes termotolerantes por mililitro, demonstrando que todas as amostras apresentaram- se acima do valor permitido pela legislação vigente. Houve presença de *Staphylococcus coagulase* positiva em 2 amostras; crescimento de fungos em outras 2 amostras; e ausência de *Salmonella* spp.. Foi acompanhado todo o processo de obtenção da bebida no estabelecimento em que foi adquirida a amostra número 4 que apresentou maior crescimento de coliformes termotolerantes e concluiu-se que o local não segue, em vários aspectos, a Resolução RDC 218.

Palavras- chave: caldo de cana, garapa, *Saccharum officinarum*, coliformes, *Staphylococcus aureus, Salmonella* spp.

ABSTRACT

The cane juice, also known as garapa, is a refreshment characterized as a viscous liquid , opaque , greenish yellow color and marketed by garapeiros on public roads, snack bars and fairs, for example, being obtained by extraction of sugar cane (*Saccharum officinarum*). Because of its artisanal extraction and high water activity, favorable temperature and pH favorable of the raw material, the broth could be a high source of contamination. The present study evaluated the microbiological quality and sanitary conditions in 5 establishments that sell sugarcane *in natura* in southern area of São Paulo between August and September 2012. The objective was to verify the presence of total and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp., and we could conclude that all samples (100%) were inappropriate for human consumption and an inspection and technical training should be implemented in establishments. All the 5 samples of sugarcane juice in natura were obtained by extraction of cane sugar, and sent to the Technology and Sanitary Food Inspection laboratory at Santo Amaro University (Unisa). The results ranged from 1,1 x 10^2 to 1,1 x 10^3 thermotolerant coliforms per milliliter, showing that all samples were above the amount allowed by law. Positive coagulase was present in 2 samples; growth of fungi in other 2 samples; and absence of Salmonella spp.. The whole process of obtaining the drink was followed at the establishment where the sample 4 was acquired, which had higher growth of thermotolerant coliforms and the conclusion was that the place doesn´t follow, in many aspects, the Resolution RDC n° 218.

Key word: cane juice, garapa, *Saccharum officinarum*, coliforms, *Staphylococcus aureus, Salmonella* spp.

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Renata Savarino Levenhagen, cujo apoio tem me permitido realizar meus ideais de profissão e vida, dedico minha amizade, admiração e respeito.

À meus pais, família, amigos e colegas pelo apoio e compreensão no decorrer do curso.

Aos professores do curso pelos ensinamentos e dedicação, também dedico minha amizade, admiração e respeito.

Agradeço ainda a todos que contribuíram direta ou indiretamente com meu trabalho, pela troca de informações e experiências.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....9
2.1 História do caldo de cana e sua matéria- prima.....9
2.2 Coliformes totais e termotolerantes.....10
2.3 Staphylococcus aureus.....11
2.4 Salmonella spp.....12
3 OBJETIVOS.....14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....15
4.1 Amostras.....15
4.2 Determinação de Coliformes totais e termotolerantes – Técnica do Número Mais Provável
(NMP).....15
4.3 Detecção de *Salmonella* spp.....18
4.4 Determinação de *Staphylococcus coagulase* positiva.....19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....20
5.1 Análise microbiológica do caldo de cana.....20
5.2 Inspeção do estabelecimento.....22
6 CONCLUSÃO.....27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....28

1 INTRODUÇÃO

Normalmente comercializado por vendedores ambulantes, denominados garapeiros, em lanchonetes, vias públicas, próximos a parques, rodoviárias, praças e feiras, o caldo de cana pode ser obtido através da moagem de cana-de-açúcar em moendas elétricas ou manuais, coado em peneiras metálicas, servido com ou sem gelo e consumido puro ou adicionado de suco de frutas ácidas (PRATI; MORETTI; CARDELLO, 2005).

Sendo que, microbiologicamente, os procedimentos vistos inadequados no manuseio de um produto alimentício comprometem a saúde humana (GALLO, 1989), o caldo pode ser uma alta fonte de contaminação, uma vez que, apresenta a forma de extração artesanal (NASCIMENTO et al.,2006) e, além disso, os manipuladores podem atuar como fonte de disseminação de microorganismos patogênicos (VANZO; AZEVEDO, 2003).

Em estudos envolvendo o caldo de cana, os microorganismos de importância a serem considerados, são essencialmente aqueles provenientes do solo e de vegetais (GALLO, 1989).

Devido apresentar uma alta atividade de água, pH e temperaturas favoráveis, a cana-de açúcar torna-se um meio propício para o desenvolvimento de microorganismos (GALLO, 1989).

A Resolução RDC n° 218, de 29 de julho de 2005 preconiza que as matérias-primas devem ser armazenadas em recipientes e / ou sobre paletes, estrados ou prateleiras, conservados limpos e protegidos do acesso de vetores e pragas, não devendo ser armazenados em contato direto com o piso. Os manipuladores também devem adotar procedimentos que minimizem o risco de contaminação dos alimentos através de medidas simples como a lavagem das mãos, capacitação em higiene pessoal, manipulação higiênica e do controle de doenças veiculadas por alimentos (BRASIL, 2005).

Para os diferentes grupos de produtos alimentícios, com fins de registro e fiscalização há uma tolerância máxima de coliformes termotolerantes segundo os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. No caso, o caldo de cana se adéqua ao grupo de alimentos como sucos e refrescos in natura, incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares, isolados ou em misturas, sendo a

tolerância para amostra indicativa de 10^2 coliformes termotolerantes a 45ºC por mililitro (mL) (BRASIL 2001).

As condições higiênico-sanitárias precárias de estabelecimentos que comercializam este tipo de produto, aliadas à falta de treinamento e conhecimento dos vendedores sobre a manipulação de alimentos, podem representar risco à saúde pública (SILVA, 1995; ENEO, 1995).

Bactérias, fungos e vírus podem invadir o tecido de uma planta durante as diversas fases de desenvolvimento do vegetal e a probabilidade de deterioração aumenta conforme a maior parte do tecido é invadida, principalmente em manuseio mecânico que produz quebra do tecido e permite a penetração de microorganismos (TRABULSI, 2008).

As condições ambientais e de armazenamento, características dos contaminantes e propriedades físico- químicos do alimento influenciam na extensão do crescimento microbiano por bactérias, leveduras e fungos (PELCZAR, 1996).

O presente estudo visa analisar microbiologicamente, amostras de caldos de cana comercializados na zona sul de São Paulo através da verificação da presença de coliformes totais, termotolerantes, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. e as condições higiênico- sanitárias dos estabelecimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História do caldo de cana e sua matéria- prima

A cana-de-açúcar, cuja espécie é a *Saccharum* spp, pertence à divisão *Embryophita*, subdivisão *Angiospermae*, classe *Monocotyledonae*, ordem *Glumiflorae*, família *Poaceae*, tribo *Andropogonae*, subtribo *Saccharae* e gênero *Saccharum* (ALVES, 2004). Sendo a *S. officinarum* a espécie mais plantada no Brasil por apresentar baixo conteúdo de fibras e alto teor de sacarose (CHEN, 1985). Originou-se no Sudeste da Ásia e vem sendo muito cultivada em países tropicais e subtropicais (CARVALHO et al., 2007).

No Brasil, trazida da Ilha da Madeira pelos portugueses em 1502, tornou-se uma das plantas de elevada importância econômica em nível mundial (HOFFMANN et al., 2006) e em São Vicente iniciou-se seu cultivo em 1522, porém, em Pernambuco foi mais cultivado devido condições ideais para seu desenvolvimento nas terras úmidas de massapé (BAYNA, 1978).

O caldo é constituído por 74 a 80% de água e 20 a 26% de sólidos e destes sólidos, 97% correspondem a açúcares e os 3% restantes compreendem inúmeras substâncias orgânicas e inorgânicas (MAIA 2006) e caracterizado como um líquido viscoso, opaco, de cor amarela esverdeada, de composição química variável e complexa (PAYNE, 1989), apresenta açúcares, coloides, proteínas, pentosanas, pectinas, gorduras, gomas, ceras, albuminas, silicato coloidal e materiais corantes como clorofila e antocianinas (OITICICA et al.,1975).

A acidez do caldo é aumentada nas canas queimadas, doentes, não maduras atacadas por insetos e quando são cortadas há vários dias (sofrendo acidez artificial e microbiana), assim, em meio ácido, a sacarose e açúcares são destruídas, podendo resultar em perdas indeterminadas e alterando a coloração do caldo e outras características organolépticas (OITICICA et al, 1975).

2.2 Coliformes totais e termotolerantes

O termo coliforme é empregado para a descrição de enterobactérias capazes de fermentar a lactose ou descrever outros membros da família que compreendem mais de 28 gêneros e 80 espécies (QUINN et.al., 2005).

Os coliformes totais apresentam cerca de 20 espécies, sendo elas caracterizadas por bastonetes gram-negativos e não esporogênicos, podendo ser aeróbios ou anaeróbios facultativos (SILVA, 2007).

Os coliformes termotolerantes, também denominados de fecais, são compostos por três gêneros: *Escherichia, Enterobacter e Klebsiella*, sendo as cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* de origem não fecal, consequentemente, a *Escherichia coli* é a mais conhecida dentre as espécies de coliformes fecais (SILVA, 2007).

A diferença entre os coliformes totais e os termotolerantes, em capacidade de fermentar lactose com produção de gás, é o tempo e a condição de temperatura que no caso dos totais é de 24 a 48 horas a 35ºC e os termotolerantes de 24 horas a 44,5- 45,5ºC (SILVA, 2007).

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, a *Escherichia coli* é capaz de causar infecções intestinais e extra- intestinais (ExPEC) e permanecem localizadas ou se transformam em infecções sistêmicas, nestes casos, são frequentes as bacteremias que é desencadeada pela translocação das enterobactérias do intestino para a corrente sanguínea (TRABULSI, 2008).

Dentre as diversas espécies de *E.coli* existentes, cinco categorias são consideradas diarreicogências, ou seja, causam infecção intestinal por diferentes mecanismos. São elas: *E.coli enteropatogênica* (EPEC); *E.coli enterohemorrágica* (EHEC); *E.coli enteroagregativa* (EAEC); *E.coli enterotoxigênica* (ETEC); e *E.coli enteroinvasora* (EIEC) (TRABULSI, 2008).

As linhagens da EHEC são produtoras de toxinas e acometem exclusivamente o intestino grosso (JAY, 2005).

A EPEC é caracterizada por provocar lesão característica no epitélio intestinal conhecida como lesão attaching – effacing (TRABULSI, 2008).

A ETEC tem capacidade de produzir as enterotoxinas termolábil e termoestáveis; atua como patógeno de animais provocando disenteria em bovinos e

diarréia neonatal e pós desmame em suínos e como consequência disso, provoca perdas econômicas no setor agropecuário (TRABULSI, 2008).

A EIEC tem predileção com a mucosa do cólon do homem, onde se interage com o homem em forma de parasita- hospedeiro. As manifestações clínicas associadas com a doença são febre, mal-estar, cólicas abdominais e diarréia aquosa seguida de disenteria de poucas fezes, muco e sangue (TRABULSI, 2008).

Ressalta-se que, por ser considerada uma espécie universal, a *E.coli* faz parte da microbiota normal tanto em humanos quanto em diversos animais domésticos e silvestres sendo capaz de causar infeccção em todos estes (TRABULSI, 2008).

2.3 *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, sendo a maioria anaeróbia facultativa e catalase- positiva; são imóveis; não formam esporos; e, medindo cerca de 1µm de diâmetro, tem tendência a agruparem em arranjos semelhantes a cachos de uva (QUINN, 2005).

Sabe- se que a patogenicidade do agente está correlacionada à produção de coagulase, porém, isso não significa que os de coagulase negativa sejam pouco virulentos, pois alguns são capazes de causar doenças em humanos e animais (QUINN, 2005).

Dentre as diversas enzimas extracelulares produzidas pelo *Staphyloccoccus aureus*, a mais conhecida é a coagulase devido sua presença caracterizar a espécie.

Através da transformação da protrombina em trombina e ativação e formação de fibrina a partir do fibrinogênio, a coagulação é estabelecida (TRABULSI, 2008).

Classificam-se as toxinas em citotoxinas, superantígenos e toxinas esfoliativas. Das citotoxinas, a α- toxina, também conhecida como α- hemolisina, tem capacidade de lisar hemácias, promovendo a formação de poros na membrana celular dos leucócitos e estimular o extravasamento do conteúdo celular e morte da célula (TRABULSI, 2008).

Compreendem as toxinas de superantígenos, a TSST-1 (toxic shock syndrome toxin – 1), que provoca a síndrome do choque tóxico estafilocócico, e as enterotoxinas estafilocócicas (TRABULSI, 2008).

A intoxicação alimentar estafilocócica é considerada uma das intoxicações alimentares mais frequentes, sendo causada pelas *Staphylococcal enterotoxins* (SE), essa intoxicação é dada através da ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado pela bactéria que pode estar ainda viável ou não (TRABULSI, 2008). O crescimento bacteriano ocorrerá quando o alimento contaminado permanecer desprovido de refrigeração, ou seja, à temperatura ambiente ou estufa (TRABULSI, 2008).

Muitas vezes as amostras de *S. aureus* que contaminam os alimentos são provenientes de indivíduos que manipulam esses alimentos, podendo ser portadores assintomáticos ou indivíduos que apresentam algum tipo de infecção, geralmente cutânea. As manifestações clínicas podem variar entre náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais, tendo início em média de quatro horas após a ingestão e duram cerca de 12 horas (TRABULSI, 2008).

Devido as enterotoxinas serem termoestáveis a cocção dos alimentos não as destroem, portanto, o *S. aureus* pode estar presente em alta quantidade no alimento em que a enterotoxina está presente, sendo esta a responsável pelas manifestações clínicas (TRABULSI, 2008).

O subgrupo *aureus epidermidis*, pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são estafilococos do tipo coagulase negativos, sendo alguns deles descritos como agentes patogênicos (BEER, 1988).

2.4 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* apresenta mais de 2.400 sorotipos, podem sobreviver em locais protegidos da luz e em solos úmidos por mais de nove meses (QUINN, 2005).

Pessoas envolvidas na preparação de alimentos que estão com as mãos contaminadas, podem transmitir salmonelas.

Quando as bactérias sobrevivem e se multiplicam em número suficiente, surgem os sintomas de gastroenterite da salmonelose. Cerca de oito a quarenta e oito horas após a ingestão do alimento contaminado com o agente, o hospedeiro

apresenta dor abdominal súbita associada a diarréia aquosa, podendo conter muco ou sangue (PELCZAR, 1997).

As endotoxinas das salmonelas ou produção da enterotoxina podem ainda causar os sintomas de náuseas, vômito e febre de 38 a 40ºC.

Apesar dos sintomas cessarem em dois a cinco dias, a doença pode ser considerada fatal em crianças e idosos que apresentam baixa resistência à infecção (PELCZAR, 1997).

Em adultos sãos a gastroenterite pode ser denominada de intoxicação alimentar por enfatizar a transmissão das salmonelas pelos alimentos de origem animal (TRABULSI, 2008).

As salmonelas não –tifóides são as responsáveis pela infecção aguda da mucosa intestinal caracterizando-se por infiltração e transmigração epitelial de neutrófilos, exsudação de líquido seroso e infecção no homem, limitando-se ao intestino seguida de diarréia inflamatória autolimitada (TRABULSI, 2008).

Além de diarréia os principais sintomas associados consistem em dores de cabeça, febre de 38ºC a 39ºC, cólicas abdominais e calafrios, e em casos raros, há relatos de choque hipovolêmico, megacólon tóxico e perfuração intestinal (TRABULSI, 2008).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de caldo de cana *in natura* comercializado nos estabelecimentos localizados na zona Sul de São Paulo.

E como objetivo específico verificar a presença de coliformes totais, termotolerantes*, Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras foram coletadas em cinco estabelecimentos que processam e comercializam caldo de cana, localizados em diversos pontos da zona Sul de São Paulo. Foram coletadas 5 amostras de caldo de cana *in natura* (sem gelo), sendo uma amostra por estabelecimento comercial, em garrafas plásticas próprias para seu transporte fornecidas pelos próprios estabelecimentos, no período de agosto e setembro de 2012. Algumas amostras foram armazenadas temporariamente em refrigeração e outras em bolsa isotérmica com gelo até a chegada ao laboratório de Tecnologia e Inspeção Sanitária de Alimentos da Universidade de Santo Amaro (Unisa).

Os produtos foram submetidos a análises para a identificação e quantificação de Coliformes totais e termotolerantes, e *Staphylococcus aureus*, e presença de *Salmonella* spp. seguindo os padrões microbiológicos exigidos pela Resolução RDC n°12 de 02/01/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

O método de Diluição em série e a técnica do Número Mais Provável (NMP) foram empregados segundo legislação pelo MAPA.

4.2 Determinação de Coliformes totais e termotolerantes – Técnica do Número Mais Provável (NMP)

Utilizou-se Peptone Water 0,1% (água peptonada) como diluente para a técnica de fermentação em tubos múltiplos e como meio de cultura, o Lauryl Tryptose Broth (Caldo lauril sulfato triptose), através de três diluições e incubação de 35ºC por 48 horas, obtendo-se assim, o teste presuntivo de coliformes totais.

Pipetou-se 25 mL da amostra e adicionou-se a 225 mL de água peptonada 0,1%. Esta foi considerada a diluição -1.

Para as seguintes diluições foram pipetadas 9 mL de água peptonada 0,1% e distribuídos em cada tubo de ensaio, formando os diluentes.

Do meio de cultura caldo lauril foi utilizado 5,34g para 150 mL de água destilada em um Erlenmeyer que posteriormente foram pipetados 9 mL para cada tubo de ensaio contendo um tubo de Durham invertido. No total foram utilizados 15 tubos de ensaio para cada amostra.

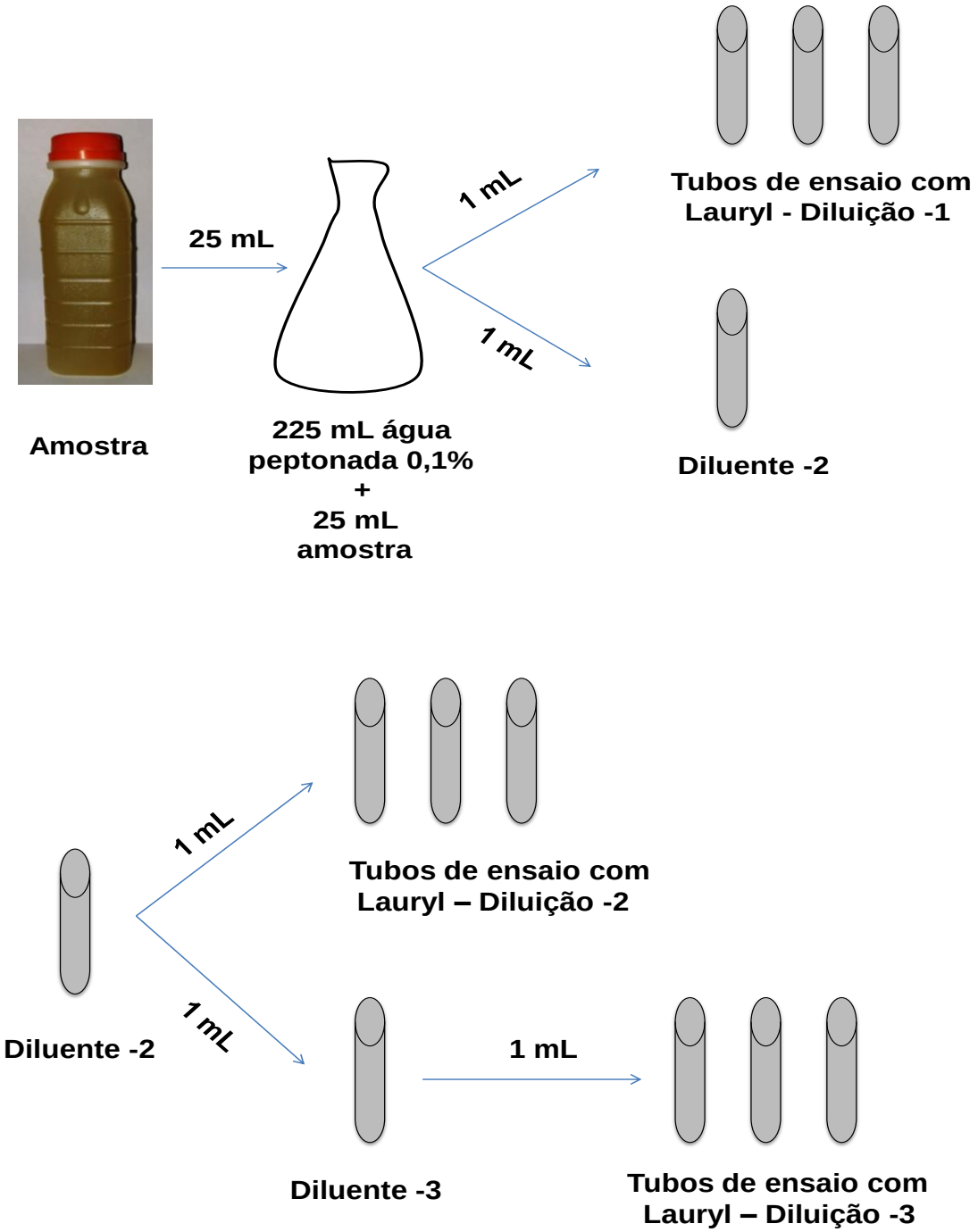
Todos os meios foram autoclavados antes de receberem as amostras e os procedimentos realizados em ambiente asséptico com auxílio do bico de Bunsen.

Após ser autoclavado, no Erlenmeyer contendo a água peptonada 0,1%, adicionou-se 25 mL da amostra de caldo de cana e homogeinezada e esta foi considerada a diluição -1. Desta mistura, inoculou-se 1 mL para o tubo do segundo diluente e 1 mL para cada um dos primeiros 3 tubos de ensaio com o meio lauril que consistiam na primeira diluição. Do tubo de segundo diluente foi inoculado 1 mL para o terceiro diluente e para os tubos da segunda diluição e, por fim, do tubo de terceiro diluente foi inoculado 1 mL para os tubos de terceira diluição. Todo esse processo da técnica de fermentação em tubos múltiplos realizado está ilustrado na figura 1.

Os tubos positivos com presença de bolhas de gás contidas nos tubos de Durhan e turvação do meio foram transferidos com auxilio de uma alça de platina para outros tubos contendo meio de cultura EC e incubados a 45ºC por 48 horas, este teste é considerado o teste confirmatório de coliformes termotolerantes.

Para a leitura do resultado, utilizou-se a tabela de NMP (Número Mais Provável).

Figura 1 – Técnica de fermentação em tubos múltiplos através de três diluições, utilizando o caldo lauril sulfato triptose como meio de cultura e água peptonada 0,1% como diluente.



4.3 Detecção de *Salmonella* sp.

Em um Erlenmeyer foi adicionado 2,25g do meio Buffered Peptone Water 1% (água peptonada tamponada) com 225mL de água destilada para a formação do meio de pré- enriquecimento.

Através da adição de 25mL da amostra com o meio de pré-enriquecimento água peptonada tamponada e incubação a 35ºC por 24 horas, recupera-se a possível presença das espécies de *Salmonella* danificadas na bebida antes do isolamento, sendo caracterizada pela fase de pré enriquecimento. Portanto, após este processo, pipetou-se 1 mL da solução para meio de cultura Caldo Selenito Cistina e 0,1 mL da solução para meio de cultura Caldo Rappaport Vassiliadis e destinando-os ao banho-maria durante 24 horas, caracterizando agora pela fase de enriquecimento seletivo.

O meio composto pelo caldo selenito cistina foi formado a partir de 0,38g de caldo selenito cistina com 20mL de água destilada dispostos em um béquer para ferver no bico de Bunsen, homogeneizando e sendo depositado 10 mL em um tubo de ensaio estéril. E o meio composto pelo caldo rappaport vassiliadis foi formado a partir de 1,33 mg de caldo rappaport vassiliadis com 50 mL de água destilada, porém, este não recebeu fervura, sendo depositado 10mL em tubo de ensaio e autoclavado.

Após este período, foi realizado plaqueamento com estrias de diluição realizadas com o auxílio da alça de platina em meios seletivos Brilliant Green Bile Ágar 2% (ágar verde brilhante) e Xylose Lysine Deoxycolato Agar (Ágar Xilose-Lisina Deoxicolato) com incubação a 35ºC durante 24 horas.

Para a formação dos meios seletivos, foram utilizados 29g de caldo verde brilhante para 500mL de água destilada e 28,34g de Agar xilose- lisina deoxicolato para 500mL de água destilada, sendo autoclavados e disponibilizados em placas de Petri.

4.4 Determinação de *Staphylococcus coagulase* positiva

O meio de pré-enriquecimento Peptone Water 0,1% (água peptonada) foi utilizado como diluente para a técnica de fermentação em tubos múltiplos, citado anteriormente para determinação de coliformes totais.

O meio de cultura para *Staphylococcus aureus* consistiu na associação de meio Baird-Parker Agar Base e Egg Yolk enriquecido com telurito em placa de Petri.

Foi utilizado 0,1 mL de cada diluição, que foi utilizada na técnica de fermentação em tubos múltiplos, e espalhado com alça de Drigalsky de vidro e incubado a 35ºC durante 48 horas. Neste período darão origem as colônias que serão contadas, sendo denominadas de unidades formadoras de colônias (UFC). Para que os resultados obtidos sejam estatisticamente válidos, realiza-se a duplicata de placas para cada diluição.

A técnica spread plate permitiu a determinação do número de microorganismos presentes na suspensão através dos métodos de contagem em placa. E com esse resultado, verificou se havia *Staphylococcus coagulase* positiva utilizando método de tubo direto com plasma de coagulase, pois o critério mais aceito para a identificação destes organismos patogênicos é baseado na presença de coagulase de enzimas.

O meio coagulase foi formado a partir da adição de 3 mL de soro fisiológico com 0,5 mL de coagu plasma em tubos de ensaio estéreis. O soro fisiológico foi constituído de 0,85g de cloreto de sódio e 100mL de água destilada.

O método consiste em retirar uma unidade formadora de colônia do meio de cultura em que houve crescimento de *Staphylococcus aureus* com auxílio da alça de platina e trasferir para o meio coagulase, acondicionar por 24h na estufa a 35ºC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise microbiológica do caldo de cana

Os resultados encontrados nas análises do caldo de cana, quanto a presença de Coliformes Termotolerantes e *Staphylococcus coagulase* positiva estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados Microbiológicos das de Coliformes Termotolerantes (NMP/mL) e *Staphylococcus coagulase* positiva das amostras de caldo de cana (presente ou ausente).

	Resultados microbiológicos	
Amostra	Coliformes Termotolerantes	Staphylococcus coagulase positiva
1	4,6 x 10^2 NMP/mL	Presente (1,1 x 10^2 UFC)
2	4,6 x 10^2 NMP/mL	Ausente
3	2,1 x 10^2 NMP/mL	Presente (3,6 x 10 UFC)
4	1,1 x 10^3 NMP/mL	Ausente
5	1,1 x 10^2 NMP/mL	Ausente
Padrão	1,0 x 10^2 NMP/mL	Ausente

Das 5 amostras analisadas todas as 5 (100%) apresentaram crescimento de bactérias termotolerantes, acima do valor permitido pela legislação vigente (10^2/mL).

Observou-se a presença de coliformes totais e termotolerantes através da turbidez dos meios e produção de gás no interior dos tubos de Durhan e os resultados foram confirmados por meio da tabela do Número Mais Provável (NMP).

Os valores obtidos variaram de 1,1 x 10^2 a 1,1 x 10^3 coliformes termotolerantes por mililitro. Portanto, sendo impróprias para o consumo humano, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n°12, de 02 de janeiro de 2001.

Sabendo-se que a superfície da pele é comumente habitável por *Staphylococcus aureus*, segundo Pelczar (1996), devemos tentar minimizar a presença deste com a higienização das mãos ao manipular alimentos e utensílios.

O *Staphylococcus* coagulase positiva esteve presente em 2 amostras.

Embora não haja limite da quantificação de *Staphylococcus coagulase* positiva segundo a legislação, seria ideal a limitação dessa, pois segundo Quinn (2005), a produção de coagulase é um fator importante devido ser indicador de patogenicidade.

Segundo Borges (2006) há estudos comprovando que algumas espécies de Staphylococcus coagulase negativa podem ser fontes de infecção por produção de enterotoxinas.

Em 2 amostras houveram crescimento de fungos. Nas amostras de Felipe e Miguel (2011) também constatou-se a presença de bolores de fungo, porém, os autores justificaram com base na Resolução RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde em que não estabelece padrões para contagem de bolores e leveduras, servindo portanto como um indicador de qualidade higiênica dos alimentos.

No entanto, sabe-se que a presença de bolores e leveduras são comuns em caldo de cana e sucos de frutas, evidenciando preocupação devido estes microorganismos provocarem deterioração e alguns produzirem micotoxinas (SILVA, 2001; JUNQUEIRA, 2001; SILVEIRA, 2001).

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras, porém, apesar dos alimentos de origem animal serem mais comumentes na transmissão das salmonelas, não deve-se descartar a hipótese de serem encontradas em produtos de origem vegetal, pois segundo Trabulsi (2008), a transmissão para o homem ocorre geralmente pelo consumo de alimentos contaminados em geral e sua prevenção consiste basicamente em adequado preparo e manipulação destes.

5.2 Inspeção do estabelecimento

No estabelecimento em que foi adquirida a amostra número 4, que apresentou maior crescimento de coliformes termotolerantes, acompanhou-se desde o processo de moagem e extração do caldo de cana até o acondicionamento do caldo na embalagem. Observou-se primeiramente que a cana de açúcar é passada cerca de 2 a 3 vezes no equipamento para o máximo aproveitamento do produto (figuras 2 e 3); o caldo atravessa um compartimento onde há uma espécie de peneira própria do equipamento que retém o bagaço (figura 4); ainda assim, o estabelecimento adicionou mais uma peneira tradicional de plástico (figura 5); depois, o caldo é depositado em um recipiente plástico do tipo ‘’tapeware’’(figuras 5 e 6); e por fim, o caldo é transferido para o copo ou garrafa plástica com auxílio de um funil de plástico (figura 6).

Figura 2 – Passagem da cana de açúcar no equipamento

Figura 3 – Passagem da cana pelo equipamento

Figura 4 – Peneira própria do equipamento

Figura 5 - Peneira de plástico (azul) adicionada pelo estabelecimento

Figura 6 – Caldo de cana sendo depositado em uma garrafa plástica com auxílio de um funil de plástico (verde) e sendo novamente coado pela peneira de plástico (azul), através do recipiente ‘’tapeware’’.

O equipamento de moagem da cana original contém uma torneira após o compartimento com a peneira para depositar diretamente no copo ou garrafa em que será servida a bebida pronta para o consumo, porém, o estabelecimento adequou de outra maneira devido não apresentar a torneira.

O estabelecimento localiza-se próximo a uma avenida movimentada em que há transeuntes, automóveis e pombos; os 3 funcionários apresentavam-se parcialmente paramentados com touca e avental; o equipamento estava totalmente desprotegido, nas condições em que pedestres passavam ao lado e moscas e pombos circulavam no local; manipulavam dinheiro e alimento, não realizando a higienização das mãos em nenhum momento do atendimento.

Um treinamento técnico de boas práticas de manipulação de alimentos foi sugerido aos cinco estabelecimentos, porém, nenhum deles permitiu alegando falta de tempo.

O ideal seria implantar boas práticas de manipulação com métodos básicos como higienização das mãos; não manipulação de dinheiro seguido de alimentos e vice-versa; uso de paramentação; limpeza do local; não utilização de adornos como pulseiras, brincos, colares e entre outros.

Assim como Carvalho e Magalhães (2007) notaram em seu estudo que alguns comerciantes armazenavam as canas de açúcar ao ar livre desprotegidos de contaminantes e do acesso de pragas e vetores, estando à mostra dos consumidores com o intuito de atraí-los e, portanto, não seguindo a resolução RDC n° 218, de 29 de julho de 2005.

Esta mesma resolução estabelece que os utensílios e as superfícies dos equipamentos e dos móveis que entram em contato com alimentos e bebidas devem ser de material liso, impermeável, lavável que não transfira substâncias tóxicas, odores e sabores indesejáveis, devendo ser de fácil limpeza e resistentes à corrosão e a repetidas operações de limpeza. Além disso, os equipamentos de moagem e de extração utilizados para o preparo de bebidas com vegetais devem dispor de meios de proteção que evitem o acesso de vetores e pragas, inclusive quando em desuso.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se dizer que as condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos que comercializam caldo de cana analisados são inadequadas, pois apesar de não ser detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras, todas as 5 amostras de caldo de cana (100%) apresentaram crescimento de coliformes termotolerantes acima do valor permitido de acordo com a resolução RDC n°12, de 02 de janeiro de 2001.

Houve presença de Staphylococcus coagulase positiva em 2 amostras e, apesar de não haver limite da quantificação segundo a legislação, há estudos que comprovam a patogenicidade destes microorganismos somente pela sua presença.

Além disso, houve crescimentos de bolores de fungos, indicando baixa qualidade higiênica do produto e consequentemente, sendo impróprio para o consumo humano.

No presente estudo, foram observadas as condições de armazenamento das canas-de-açúcar antes da moagem e estas apresentaram-se desprotegidas da luz solar, estando frente à avenidas ou vias públicas de intenso trânsito de veículos, pessoas e, até mesmo, pombos que são considerados importantes vetores de contaminação e doenças. Observou-se inclusive que alguns dos comerciantes que manipulavam o produto também manipulavam o dinheiro e em 3 locais houve falta de paramentação destes. Todas essas ocorrências infringem a Resolução RDC n°218, de 29 de julho de 2005.

Conclui-se que a contaminação pode ser proveniente da matéria-prima, equipamentos utilizados para a extração do caldo, do ambiente e/ou dos manipuladores e vetores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T. A. **Caracterização da cana-de-açúcar –** Perspectivas do Setor Sucroalcooleiro na Região da Alta Noroeste Paulista. UNESP, Ilha Solteira, 2004.

BAYNA, C. A. Cana na pequena indústria. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro – RJ, v. 80, n. 6, 1978. p.10-20

BORGES, M.F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de Coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. 222f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC n˚12, de 02 de janeiro de 2001.** Diário Oficial da União. Brasília: DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União - IN n°62, de 26 de agosto de 2003**. Brasília: DF, 2003.

BRASIL. Resolução RDC no 218, de 29 de julho de 2005. **Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos higiênico-sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais**. Diário Oficial da União, Brasília.

CHEN, J. C. P. **Sugarcane Handbook:** a manual for sugarcane manufactures and their chemists. 11ed. New York: John Wiley, 1985. p.20-82.

CARVALHO, L.R.; MAGALHÃES, J.T. Avaliação da qualidade microbiológica dos caldos de cana comercializados no centro de Itabuna-BA e práticas de produção e higiene de seus manipuladores. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Bahia, v.31, n.2,jul/dez,2007.p.238-245.

FELIPE, L.M.; MIGUEL, D.P. Análise da qualidade microbiológica do caldo de cana. **FAZU em Revista**, Uberaba, n.8, 2011. p.77-82.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Campinas, 1989. 388 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1989.

HOFFMANN, P. et.al. Qualidade microbiológica de amostras de caldo de cana comercializadas no município de São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.143, 2006. p.83

NASCIMENTO, A.R. et. al. Perfil Microbiológico do Caldo de Cana comercializado na cidade de São Luís, MA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.141, 2006. p.83-86.

OITICICA, J. E. R.; BRAS, L. M. J.; CORREIA, M. M. M. **Manual de técnicas de**

laboratório e fabricação de açúcar de cana. Coleção Canavieira, n. 18, Rio de Janeiro, 1975.

PAYNE, J. H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. Nobel/ STAB, São Paulo,1989. 245 p.

PELCZAR, M.J. et. al. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. V.2. 2ed. São Paulo. Pearson Makron Books, 1997. 517p.

PRATI, P.; MORETTI, R. H.; CARDELLO, H. M. A. B. **Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada e sucos de frutas ácidas.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 25, n°1, 2005. p.147-152.

QUINN, P. J. et. al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre. artmed, 2005. 512p

SILVA, JR.; Eneo, A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentos**. 6ed. São Paulo: Varela, 1995. 479p.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F, de A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos.** 2ed**.** São Paulo, Varela, 2001. 317p.

SILVA , N. et. al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ed. São Paulo. Livraria Varela, 2007. 544p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5ed. São Paulo. Atheneu. 2008. 760p.

VANZO, S.P.; AZEVEDO, R.V.P. Detecção de *S. aureus* em manipuladores de alimentos – perfi l de resistência a antibióticos e quimioterápicos. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, 2003. p.114- 123.