

TRABALHO ORIENTADO: AVALIAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI EM SALADAS COMERCIALIZADAS EM ALEGRE, ES

Vinicius Valadão Machado De Carvalho, Leonardo Bindelli Verly, Icaro Siqueira Casagrande, Kailane Pimenta Inácio, Thays Eller Vasconcelos de Lima, Rodolfo Moreira Baptista, Yasmin Pena Santos.

Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, S/N - Guararema, Alegre - 29500-000 – Alegre - ES, Brasil,
viniciusmachado3d@hotmail.com, leobindelli@gmail.com, icaro.casagrande@hotmail.com,
kailanepimentainacio@gmail.com, thayseller22@gmail.com, rodolfombaptista@outlook.com,
yasminpna2@gmail.com.

Resumo

A busca por praticidade no preparo das refeições tem se tornado uma tendência na sociedade brasileira. Com a crescente demanda, a comercialização de produtos minimamente processados, como as saladas prontas para consumo, demonstra um aumento significativo no mercado. Entretanto, os riscos associados à saúde do consumidor final devem ser investigados por conta da possível contaminação durante o preparo desses alimentos. Neste estudo, foi avaliado o teor de coliformes totais e de *Escherichia coli* presentes em uma salada pronta para consumo que foi adquirida em um mercado do município de Alegre, localizado na região do Caparaó Capixaba, Brasil. Os resultados obtidos indicaram a presença significativa de coliformes totais e *E. coli* (NMP/mL >1100), ultrapassando os limites inferidos pela legislação brasileira. Os resultados apontam que o produto comercializado se encontra impróprio para consumo humano e esse desvio de qualidade representa um risco à saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Contaminação alimentar. Microbiologia de alimentos. Produto minimamente processado.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Microbiologia

Introdução

No cenário contemporâneo, marcado pela rapidez do dia a dia e pela exigência crescente por soluções práticas, percebe-se um aumento significativo no número de consumidores que preferem adquirir alimentos pré-cortados, descascados e prontos para o consumo, ao invés de preparar suas refeições com ingredientes frescos e *in natura* (Amorim, 2011).

Contudo, os profissionais da área de alimentação expressam preocupações notáveis em relação a diversos problemas, incluindo a segurança alimentar, que pode ser comprometida pelo aumento do tempo de exposição a temperaturas inadequadas, além da insuficiência na educação alimentar dos consumidores (Coelho *et al.*, 2010). O controle rigoroso dos manipuladores de alimentos é um componente crucial, uma vez que indivíduos doentes ou assintomáticos podem ser responsáveis por até 26% dos surtos de doenças bacterianas transmitidas por meio dos alimentos. Esse risco é equiparado à contaminação ocasionada por equipamentos e utensílios que não foram devidamente higienizados (Coelho *et al.*, 2010).

Esses produtos podem conter microrganismos que representam sérios riscos à saúde pública, resultando também em consideráveis perdas econômicas. As síndromes decorrentes da ingestão de alimentos contaminados são denominadas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ou Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) (Queiroz, 2016). Dor abdominal, náusea, vômitos, diarreia e febre são os sintomas mais comuns de DTA ou DVA. Os sintomas podem durar de algumas horas a mais de cinco dias, dependendo do estado físico do paciente, do tipo de microrganismo ou toxina ingerido e da quantidade de alimentos consumidos (Welker *et al.*, 2010).

Dentre os principais agentes etiológicos relacionados a essas enfermidades, destacam-se *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, entre outros (Oliveira *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de coliformes em alimento minimamente processado durante as aulas práticas da disciplina de Microbiologia de Alimentos ofertada pelo curso superior em Farmácia, da Universidade Federal do Espírito Santo *campus* Alegre.

Metodologia

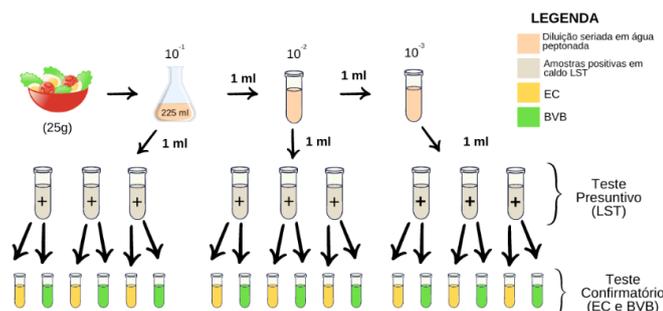
Para realização do trabalho foram utilizados tubos de ensaio contendo caldo LST (Lauril Sulfato Triptose), caldo BVB (Bile Verde Brilhante), caldo EC (*E. coli*), frasco contendo 225 mL de solução diluente (água peptonada a 1%) e tubos de ensaio contendo 9 mL da mesma solução. Os materiais foram previamente preparados no laboratório de Análises Clínicas, do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). A amostra utilizada para a análise foi uma salada minimamente processada composta por tomate, alface, repolho e cenoura, obtida em um supermercado da cidade de Alegre, Espírito Santo.

Com o auxílio de algodão e álcool 70%, a embalagem da amostra foi brevemente desinfetada e em seguida homogeneizada, com o objetivo de se obter uma amostra representativa. O saco esterilizado foi aberto dentro da zona de esterilidade e adicionado a ele 25 g da amostra. Posteriormente, a alíquota pesada foi adicionada em 225 mL de solução diluente de água peptonada a 1%, correspondendo à diluição 10^{-1} . Após, com auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 1 mL da diluição 10^{-1} foi transferida para um tubo contendo 9 mL do diluente (diluição 10^{-2}). As diluições seriadas foram realizadas até a obtenção da diluição correspondente a 10^{-3} que sequencialmente foram posicionadas sobre o vórtex sob agitação por 10 segundos (Figura 1 e 2).

Para execução do teste presuntivo para a enumeração de coliformes em alimentos, foram pipetados em triplicata a alíquota de 1 mL de cada uma das diluições preparadas anteriormente. Os tubos foram inoculados correspondendo à 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente, em tubos com caldo LST (Lauril Sulfato Triptose), juntamente com tubos de Durham invertidos.

Finalmente, as amostras foram identificadas e incubadas a uma temperatura de 36 ± 2 °C por um período de 24 horas em estufa bacteriológica. Após esse período, foi retirado uma alíquota de 1 mL das amostras que demonstraram turbidez e presença de gás nos tubos de Durham e posteriormente depositados em tubos contendo caldo BVB (Bile Verde Brilhante) e caldo EC (*Escherichia coli*), a fim de detectar a presença de coliformes. Os valores obtidos em cada uma das análises foram comparados com a tabela de Número Mais Provável (NMP) para as diluições seriadas de três tubos. Os resultados foram expressos como NMP presuntivo de coliformes por mililitro. A escolha dessa metodologia se justifica pela sua eficácia em detectar a presença de microrganismos indicadores de contaminação, que podem comprometer a segurança alimentar desse tipo de produto. Ao identificar e quantificar esses coliformes, o estudo busca contribuir para a avaliação da qualidade microbiológica das saladas prontas para consumo.

Figura 1 – Esquema representativo dos procedimentos obtidos no experimento



Fonte: Os autores (2024).

Figura 2 – Transferência da alíquota de 10^{-1} para o tubo de 10^{-2}

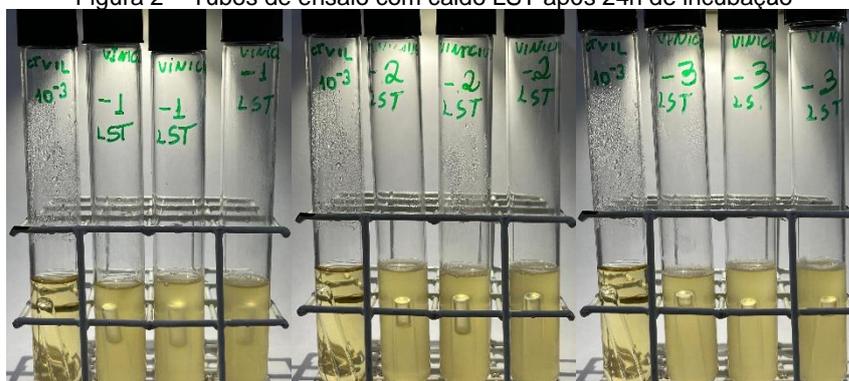


Fonte: Os autores (2024).

Resultados

Após o período de 24h de incubação, foi observado o turvamento e a formação de gases no interior dos tubos de Durham em todos os 9 tubos de ensaio contendo caldo LST que foram utilizados, representando a presença de coliformes totais em todas as diluições realizadas (Figura 2).

Figura 2 – Tubos de ensaio com caldo LST após 24h de incubação



Fonte: Os autores (2024).

Com a confirmação presuntiva de coliformes totais, foi consultada a tabela de Número Mais Provável (NMP) para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 mL (FDA, 2022), chegando ao resultado de NMP/g >1100 com intervalo inferior de 420 e intervalo superior indeterminado.

Os resultados do caldo BVB foram semelhantes aos do caldo LST, apresentando o turvamento de todos os 9 tubos referentes às diluições oriundas dos tubos positivos para o crescimento microbiano em caldo LST (Figura 3).

Figura 3 – Tubos de ensaio com caldo BVB após 24 de incubação



Fonte: Os autores (2024)

O resultado do teste presuntivo para *E. coli* confirmou, após 24h de incubação, a presença do microrganismo, com o turvamento e a formação de gases no interior dos tubos de Durham dos 9 tubos contendo caldo EC, referentes às diluições que foram realizadas dos tubos que positivamente o crescimento microbiano em caldo LST (Figura 4).

Figura 4 – Tubos de ensaio com caldo EC após 24h de incubação



Fonte: Os autores (2024).

O resultado do NMP para *E. coli* foi idêntico ao encontrado para coliformes nos caldos LST e BVB, obtendo-se NMP/mL >1100 com intervalo inferior de 420 e intervalo superior indeterminado, conforme descrito por FDA (2022).

A tabela e a figura a seguir demonstram os resultados obtidos nos três testes realizados (Tabela 1 e Figura 5).

Tabela 1 – Resultados obtidos nos testes de NMP para coliformes em caldo LST (LST), *E. coli* (EC) e coliformes em caldo BVB (BVB)

Teste Realizado	Número de Tubos Positivos			NMP	Intervalo de confiança (95%)	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		Inferior	Superior
LST	3	3	3	> 1100	420	-
EC	3	3	3	> 1100	420	-
BVB	3	3	3	>1100	420	-

Fonte: Os autores (2024).

Discussão

Coliformes totais são compostos por bactérias da família Enterobacteriaceae capazes de fermentar lactose, produzindo gás carbônico e ácido lático como subproduto de seu metabolismo num período de 24 a 48 horas a 32-37°C. São bacilos Gram-negativos, sendo aeróbios ou anaeróbios facultativos. A presença de coliformes em alimentos processados indica que a matéria prima pode estar contaminada, utensílios e equipamentos utilizados na fabricação podem estar mal higienizados, ou pode haver falta de higiene por parte dos manipuladores do produto (Ritter *et al.*, 2001). Além de caracterizar contaminação pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (Silva *et al.*, 1997).

A *Escherichia coli* enterotoxigênica é a causa mais comum de síndromes diarreicas, conhecidas popularmente como “diarréia do viajante”. Algumas cepas, ao serem ingeridas com alimentos ou água contaminada, desenvolvem-se no intestino e produzem toxinas que ocasionam em irritação da mucosa local além da distensão intestinal pelo líquido, provocando hipermotilidade e diarréia, durando por volta de um a três dias (Oliveira *et al.*, 2010).

A avaliação microbiológica dos alimentos é de extrema importância para a prevenção de surtos de DTA (Welker *et al.*, 2022). Segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, o Brasil registrou mais de 2,4 milhões de internações por DTA, com uma média de 570 mil

casos anuais entre 1999 e 2004 (Carmo *et al.*, 2005). Pesquisas mais recentes apontam que do ano de 2009 à 2019 houveram mais de 690.000 pessoas diretamente expostas à DTA, com taxa aproximada de 109 óbitos (Amaral *et al.*, 2021).

Os resultados dos testes presuntivos para a presença de coliformes e os testes confirmativos para a presença de coliformes termotolerante e *E. coli* apresentaram uma alarmante incongruência com os padrões normativos de qualidade microbiológica dos alimentos, segundo a Instrução Normativa - IN nº 161, de 1º de julho de 2022, vista durante as aulas teórico-práticas da disciplina de Microbiologia de Alimentos, na qual dispõe dos limites de carga microbiana para diferentes microrganismos, entre eles a *E. coli*, *Salmonella* spp. e os pertencentes à família Enterobacteriaceae. Esse desvio de qualidade representa um risco real à saúde dos consumidores desse produto, podendo tornar-se um vetor para a propagação de DTA (Brasil, 2022).

O estudo orientado desempenha um papel fundamental no aprendizado prático dos alunos de ensino superior, especialmente na área de microbiologia dos alimentos. Através de atividades práticas supervisionadas, os estudantes têm a oportunidade de aplicar conceitos teóricos em situações reais de laboratório, o que facilita a compreensão de processos complexos e o desenvolvimento de habilidades técnicas essenciais. Além disso, o estudo orientado promove a capacidade de resolução de problemas, o pensamento crítico e a autonomia, preparando os alunos para desafios profissionais futuros (Erlin; Fitriani, 2019).

Conclusão

A qualidade microbiológica da salada comercializada em Alegre, Espírito Santo, Brasil, analisada na presente pesquisa, apresentou qualidade microbiológica insatisfatória, estando em desacordo com a RDC Nº 724, de 1º de Julho de 2022, quanto aos padrões microbiológicos de coliformes discutida durante as aulas da disciplina, o que pode ocasionar eminente risco à saúde da população consumidora. Assim, a capacitação dos manipuladores para a adequada aplicação das boas práticas de produção e manipulação, adequada higienização dos equipamentos, controles de tempo e temperatura do produto, são fundamentais para que as contagens das populações microbianas pesquisadas sejam menores. Aliado a isso, uma fiscalização mais efetiva por parte dos órgãos regulatórios responsáveis e, sobretudo do fabricante/manipulador, é o principal fator determinante de qualidade/saúde do produto ofertado à população.

Para os alunos da disciplina, a vivência dessa prática foi importante pois não apenas contribuiu para o desenvolvimento de pensamento crítico como também contribuiu indiretamente para a saúde pública, compreendendo o impacto de suas ações e promovendo conscientização sobre segurança alimentar.

Referências

AMARAL, S. M. B. *et al.* Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. **Revista Científica Multidisciplinar**, v. 2, n. 11, p. e211935-e211935, 2021.

AMORIM, A. M.; NASCIMENTO, K. O. Caracterização do perfil de consumidores de alimentos minimamente processados. **Nutrição Brasil**, v. 10, n. 6, p. 347-353, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 724, de 1º de Julho De 2022. **Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 de jul. 2022.

CARMO, G. M. I. *et al.* Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, Boletim Eletrônico Epidemiológico, 1999-2004, vol. 6, Pág:1-7, 2005.

COELHO, A. Í. M. *et al.* Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1597-1606, 2010.

ERLIN, E.; FITRIANI, A. Profile metacognitive awareness of biology education students in microbiology course. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, p. 022066, 2019.

FDA. **Bacteriological Analytical Manual**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food>>. Acesso em: 10 ago. 2024.

OLIVEIRA, A. B. A. de *et al.* Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 30, n. 3 (Jul./set. 2010), p. 279-285**, 2010.

QUEIROZ, J. J. F.; SANTANA, R. F. de. Realidade bacteriológica de hortaliças: um risco à saúde. 2016.

RITTER, R. *et al.* Análise da qualidade microbiológica do queijo colonial, não pasteurizado, produzido e comercializado por pequenos produtores no Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**. v.15, n.87, p.51-55, 2001.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1997, p.31a 39, 265 a 276.

WELKER, C. A. D. *et al.* Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, 2010.

Agradecimentos

Às monitoras da disciplina de Microbiologia de Alimentos (DFN10644), Yasmin Pena Santos e Mirian de Souza Seixas, pelo apoio durante a realização das tarefas e à Universidade Federal do Espírito Santo pelo espaço e recursos cedidos.