

## CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE ALFACES COMERCIALIZADAS EM FEIRAS-LIVRES DA CIDADE DE MARINGÁ-PR.

Renata Batista de Moura Devico<sup>1</sup>; Daniele Fernanda Felipe<sup>2</sup>; Tássia Tiemi Tanaka<sup>3</sup>

**RESUMO:** Os alimentos de origem vegetal são conhecidos como fontes potenciais de microrganismos patogênicos e estão relacionados a surtos de doenças infecciosas, podendo destacar a alface, a qual é uma das hortaliças mais vendidas para o consumo cru. Os microrganismos podem contaminar os produtos de origem vegetal por diversas fontes, sendo que essa contaminação inicia-se na fase da produção nos campos, quando há contato com o solo, água, fezes de animais, insetos e manipuladores; continua durante as etapas de colheita, manuseio, transporte da matéria-prima até a indústria e durante o processamento e finaliza no preparo do produto através do consumidor. Esta pesquisa possui como objetivo, analisar os níveis de contaminação microbiológica em relação às bactérias, *Salmonella* e coliformes fecais, em amostras de alfaces cultivadas pelos métodos convencional, hidropônico e orgânico. Serão coletadas vinte e uma amostras, onde serão sete amostras obtidas pelo método convencional, sete do cultivo hidropônico e sete do cultivo orgânico, em feiras livres da cidade de Maringá-PR, sendo que para pesquisa das bactérias citadas serão utilizados os métodos de análise microbiológica de alimentos. A partir da pesquisa em questão, espera-se avaliar a qualidade microbiológica de ambos os tipos de alface consumidos, verificando se existem diferenças entre os métodos de cultivo quanto ao nível de contaminação e ainda, se há risco das amostras causarem toxinfecções.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alface; Toxinfecções; Qualidade microbiológica.

### INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado mudanças no comportamento alimentar da população, basicamente no que se refere à elevação no consumo de hortaliças *in natura*. Esse fato é devido principalmente, à busca de melhores padrões de saúde, os quais podem ser obtidos através de uma boa alimentação. A característica *in natura* desses produtos, associada às técnicas de processamento brandas e às condições de estocagem, criam um novo ecossistema onde microrganismos patogênicos e deterioradores podem crescer.

Na maioria dos países, incluindo os de elevado padrão de vida, existem grandes números de relatos sobre enfermidades transmitidas por alimentos. A situação tende a ser mais grave em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde as condições precárias de infra-estrutura e educação sanitária contribuem para elevar o número destes casos (BEZERRA; FURTADO; SOUZA, 2006). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) elaborou a Resolução RDC n<sup>o</sup>. 12, (BRASIL, 2001), que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, visando a proteção à saúde da população.

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso Nutrição. Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Vinculada ao PICC. E-mail: renatadevico@hotmail.com. <sup>2</sup> Docente do CESUMAR. Vinculada ao curso de Farmácia e Nutrição do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. E-mail: daniele.felipe@uol.com.br <sup>3</sup> Pesquisadora, vinculada ao PICC, no Centro Universitário de Maringá Paraná. E-mail: tassia\_tt@hotmail.com.

A incorreta manipulação, do ponto de vista higiênico-sanitário, nas etapas de produção, como a qualidade da água utilizada na irrigação, colheita, transporte, armazenamento e comercialização são fatores importantes, que nem sempre satisfazem o aspecto microbiológico, além do contato da hortaliça com o solo e ar, ocorrendo perdas quantitativas e qualitativas (BEZERRA; FURTADO; SOUZA, 2006).

Atualmente no Brasil, a alface convencional (cultivada em solo), vem sendo substituída pela hidropônica, a qual é cultivada sobre suportes artificiais, em água, sob estufa, mas utiliza fertilizantes químicos. Este método surgiu para os produtores poderem utilizar pequenos espaços com maior produtividade e a preferência desse cultivo nos grandes mercados consumidores (FERNANDES; MARTINEZ; PEREIRA, 2002).

Além destes métodos de cultivo, há também a alface orgânica. A produção orgânica adota práticas de rotação de cultura, aproveitamento de resíduos orgânicos e controle biológico, eliminando a utilização de fertilizantes químicos. Esta técnica de cultivo apresenta uma grande vantagem comparada ao sistema convencional devido ao seu impacto benéfico ao meio ambiente (GUADAGNIN; RATH; REYES, 2005).

As doenças microbianas de origem alimentar podem ser subdivididas em duas grandes categorias: as intoxicações alimentares e as infecções alimentares. As intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas. As infecções alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo as células viáveis de microrganismos patogênicos. Estes microrganismos aderem à mucosa do intestino humano e proliferam, colonizando-o. Entre as bactérias invasivas, destacam-se *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* invasora, *Yersinia enterocolitica*, entre outras (FRANCO; LANDGRAF; 2006).

Medidas preventivas precisam ser adotadas para minimizar a contaminação dos produtos em toda a cadeia produtiva, e a implantação das Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Produção (BPP) e do programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é fundamental para o conhecimento e prevenção da contaminação e do crescimento microbiano em produtos minimamente processados. Isso porque, tem-se aumentado cada vez mais, o número de surtos de infecção ou intoxicação alimentar associados ao consumo de produtos frescos de origem vegetal (ANGELO; BEAN; DANIELS; GOULDING, 1997).

Diante do exposto, a realização da presente pesquisa torna-se importante, tendo em vista que muitas pesquisas ainda precisam ser conduzidas para se obterem produtos com uma qualidade sensorial e nutricional elevada e que sejam seguros, do ponto de vista microbiológico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Após o levantamento bibliográfico sobre o assunto em questão, foram selecionadas as feiras livres da cidade de Maringá-PR, onde foram coletadas as amostras de alfaces. Foram coletadas vinte e uma amostras de alface, sendo sete amostras cultivadas pelo método convencional, sete amostras pelo método hidropônico e sete amostras cultivadas pelo método orgânico. Após a coleta, as amostras foram preparadas para então serem utilizadas nas análises microbiológicas, pesquisando as bactérias *Salmonella*, coliformes totais e coliformes fecais (termotolerantes), sendo as análises realizadas em duplicata.

O preparo das amostras e as análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia de alimentos, seguindo metodologia abaixo:

### **PREPARO DAS AMOSTRAS**

Para o preparo, 25g da amostra foram transferidos para 225 mL de água peptonada 0,1%, sendo em seguida preparadas as demais diluições decimais seriadas,

transferindo-se 1 mL para 2 tubos de cultura contendo 9,0mL do mesmo diluente, posteriormente homogeneizados.

## **CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES FECAIS**

Para análise de microrganismos do grupo coliformes foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos. Para cada diluição decimal seriada foram preparados 3 tubos contendo meio de cultura Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Os tubos foram incubados a 35°C / 24-48 horas em que, após este período, foram considerados positivos os tubos com produção de gás no interior do tubo de Durham e turvação do meio de cultura. Para a contagem de coliformes totais foram tomados os tubos de LST positivos, sendo transferida uma alçada bem carregada para tubos contendo meio de cultura Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB). Estes foram incubados a 35°C / 24-48 horas e observados quanto à produção de gás e turvação do meio de cultura. Os tubos de VB que acaso confirmarem a presença de coliformes totais foram anotados para a determinação de Número Mais Provável (NMP)/g. Para contagem de coliformes termotolerantes foram tomados os tubos de LST positivos, sendo transferidos, novamente, uma alçada bem carregada para tubos contendo meio de cultura Caldo EC. Posteriormente, os mesmos foram incubados em banho-maria a 45°C / 24-48 horas e observados quanto à produção de gás e turvação do meio de cultura. Os tubos de EC que confirmarem a presença de coliformes termotolerantes foram anotados para determinação do Número Mais Provável (NMP/g) (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

## **DETECÇÃO DE SALMONELLA**

A primeira etapa da análise para detecção de *Salmonella* spp. consiste no pré-enriquecimento da amostra, em que o frasco contendo a diluição  $10^{-1}$  foi incubado a 35°C / 18-24 horas, com a tampa ligeiramente afrouxada. Após este período, o frasco foi agitado levemente, e então transferido uma medida 1:10 mL em tubo contendo Caldo Selenito-Cistina para enriquecimento, sendo este incubado a 35°C/24 horas. Após este período os tubos de enriquecimento seletivo foram homogeneizados, retirando uma alça, que será estriada em placas contendo meio Hektoen. As placas foram incubadas invertidas a 35°C/24 horas e, após este período, foi verificado se houve desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella* spp (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados referentes às análises microbiológicas das amostras das alfices convencional, orgânico e hidropônico estão apresentados no Quadro 1. Pode-se verificar em relação à *Salmonella* sp que das 7 amostras analisadas da alfice do método de cultivo convencional, apenas 14,28% positivaram, já nas 7 amostras da alfice do método de cultivo hidropônico 28,57% positivaram e por fim das 7 amostras da alfice do método de cultivo orgânico apenas 14,28% positivou. Entretanto no caso da *Salmonella* sp em ambos os métodos encontram-se fora dos padrões de tolerância máxima, uma vez que de acordo com a Resolução – RDC N° 12 de 2 de Janeiro de 2001, o limite permitido para o alimento em questão deve ser nulo, ou seja, ausente. Porém Costa et al. (2008), em pesquisa com saladas vegetais cultivadas pelo método convencional verificou-se que das 13 amostras analisadas obtiveram resultado negativo.

Em relação aos coliformes totais, embora a resolução RDC n° 12 da ANVISA (BRASIL, 2001) não mencione padrões microbiológicos para coliformes totais no produto analisado nota-se pelos números encontrados que algumas amostras se mostraram com contaminações elevadas, para esse grupo de bactérias que normalmente é indicador de

falta de condições higiênicas. Assim, se o valor de  $1,0 \times 10^2$  UFC/g<sup>-1</sup>, que é o máximo tolerado para coliformes a 45° (fecais) fosse tomado como referência para coliformes totais, seriam encontrados amostras fora dos padrões legais tolerados.

Desta maneira, nos coliformes totais, das 7 amostras da alface convencional todas positivamente, porém apenas 14,28% estavam de acordo com os padrões legais, o restante variou de 1.100 à  $\geq 2400$  NMP/g. Para as alfaces hidropônicas as 7 amostras positivamente, porém apenas 28,57% estavam de acordo com os padrões legais, o restante variou 240 à  $\leq 2400$  NMP/g. Por fim no método de cultivo orgânico as 7 amostras positivamente, porém 42,85% estavam de acordo com os padrões legais, o restante variou de  $<3$  à 240 NMP/g.

Verificou-se em relação aos coliformes termotolerantes, que no método de cultivo convencional as 7 amostras positivamente, estando somente 28,57% dentro dos padrões legais, o restante variou de 150 à  $\geq 2400$  NMP/g. Em relação ao método de cultivo hidropônicos apenas 25,57% se encontraram dentro dos padrões legais, variou de 150 à  $\geq 2400$  NMP/g. E por fim através do método de cultivo orgânico as 7 amostras positivamente porém, detectou-se 71,42% das amostras dentro dos padrões legais, enquanto o restante foi de 1.100 NMP/g.

Quadro 1:

<b>Alface Cultivo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Salmonella sp. UFC/g</b>	<b>Coliformes totais (NMP/g)</b>	<b>Coliformes termotolerantes (NMP/g)</b>
Convencional	1	Ausente	$\geq 2400$	$\geq 2400$
Convencional	2	Ausente	$\geq 2400$	$\geq 2400$
		$1 \times 10^1$		
Convencional	3	UFC/g	23	23
Convencional	4	Ausente	$\geq 2400$	150
Convencional	5	Ausente	1.100	28
Convencional	6	Ausente	1.100	240
Convencional	7	Ausente	$\geq 2400$	150
Hidropônico	1	Ausente	$\geq 2400$	$\geq 2400$
		$1 \times 10^1$		
Hidropônico	2	UFC/g	$\geq 2400$	$\geq 2400$
Hidropônico	3	Ausente	240	240
Hidropônico	4	Ausente	$\geq 2400$	1.100
Hidropônico	5	Ausente	23	23
		$1 \times 10^1$		
Hidropônico	6	UFC/g	$<3$	$<3$
Hidropônico	7	Ausente	1.100	240
		$1 \times 10^1$		
Orgânico	1	UFC/g	1.100	1.100
Orgânico	2	Ausente	240	9
Orgânico	3	Ausente	1.100	23
Orgânico	4	Ausente	$<3$	$<3$
Orgânico	5	Ausente	20	20
Orgânico	6	Ausente	$<3$	$<3$
Orgânico	7	Ausente	1.100	1.100

Os altos índices encontrados para os coliformes totais e termotolerantes podem estar relacionados a condições higiênico-sanitárias deficitárias, tais como, contaminação após o processamento, limpeza e má sanitização, tratamento térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem. Um dos pontos importantes a serem citados, é que não houve interferência do método de cultivo, apenas da forma de armazenamento e embalagem de cada um dos métodos. Esta alta presença de tais bactérias podem levar a toxinfecções, sendo prevenida principalmente com a lavagem

correta de tais vegetais.

## CONCLUSÃO

Desta maneira podemos concluir que de ambos os métodos de cultivo houve presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes e salmonella sp (em menor quantidade, não excedendo de  $1 \times 10^1$  UFC/g). Entretanto indubitavelmente a presença destes microorganismos, assim como suas variações na quantidade, estão relacionados principalmente à maneira de estocagem destes vegetais e suas respectivas embalagens as quais limitaram a quantidade de microorganismos existentes nos diferentes métodos de cultivo, onde o orgânico por ser uma embalagem completamente fechada houve menor presença de coliformes totais e termotolerantes, em segundo lugar se encontra a embalagem da alface hidropônica a qual é parcialmente embalada e por fim das alfaces convencionais onde são completamente expostas, lembrando que as amostras foram coletadas de feiras livres.

Por fim, faz-se necessário a lavagem correta dos vegetais folhosos em geral, assim como qualquer outro produto que fica exposto no meio ambiente, para que se possa evitar as toxinfecções e termos uma vida saudável.

## REFERÊNCIAS

BEAN, N. H.; GOULDING, J. S.; DANIELS, M. T.; ANGELO, F. J. Surveillance for food borne disease outbreaks - United States 1988-1992. **Journal of Food Protection**, v.60, p. 1265-1286, 1997.

BEZERRA, D. C. F.; FURTADO, C. M.; SOUZA, M. L. Avaliação Higiênico-Sanitária de alfaces (*Lactuca sativa L.*) cultivadas pelos processos convencional e hidropônico e comercializadas em Rio Branco, AC. **Revista Higiene Alimentar**, 20, n. 145 p. 92-99, out. 2006.

SILVA JUNIOR, Eneo Alves da. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6. ed. atual. São Paulo: Varela, 2007.

FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R. G. Nutrient sources affecting yield, nitrate concentration and nutritional status of lettuce cultivars, in hydroponics. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

GUADAGNIN, S. G.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 12, p. 1203-1208, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2001.