RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas pré-textuais não incluídas pelo(a) autor(a) no arquivo original.

DIAS, Ana Caroline Amorim. Instituto de Biociências de Botucatu. 2012. TCC - (Graduação – Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências – Botucatu, Unesp.

Qualidade higiênico-sanitária de sorvetes e sobremesas, na cidade de Botucatu, SP, Brasil, e verificação da produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus*.

Ana Caroline Amorim Dias, Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Resumo:

Alimentos podem provocar infecções ou intoxicações nos seus consumidores pela presença de bactérias patogênicas, como *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus*. Por isso, é importante a verificação da sua qualidade, que pode ser afetada por vários fatores. A qualidade higiênico-sanitária dos alimentos pode ser avaliada pelos coliformes termotolerantes. Uma vez que a segurança dos alimentos é uma questão de grande preocupação, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as condições higiênico sanitárias de amostras de sorvetes e sobremesas, comercializados na cidade de Botucatu, por meio da determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes, enumeração e identificação de estafilococos coagulase positiva e verificação da produção de enterotoxinas clássicas por cepas de *S. aureus* e também pela detecção da presença de *Salmonella* sp. Entre os sorvetes analisados, 56,3% estavam impróprios para o consumo e entre as sobremesas cremosas, a porcentagem de amostras impróprias foi de 33,3%. *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp não foram encontrados nas amostras. Verificou-se, então, uma inadequação na manipulação e/ou condições de armazenagem em um número considerável de amostras, o que indica necessidade de melhoria nas condições de preparo.

Palavras-chave: Qualidade microbiológica; coliformes termotolerantes. *Salmonella* sp*; Staphylococcus aureus;* enterotoxinas.

Abstract:

Food poisoning can cause infection on its consumers by the presence of pathogenic bacteria, such as Salmonella and Staphylococcus aureus. Therefore, it is

important to check its quality, which can be affected by many factors. The sanitary quality of foods can be assessed by thermotolerant coliform. Since food safety is a matter of great concern, this study aimed to evaluate the hygienic sanitary conditions of samples of ice cream and desserts marketed in the city of Botucatu, by determining the most probable number (MPN) of thermotolerant coliform, identification and enumeration of coagulase positive staphylococci and verification of classical enterotoxin production by strains of S. aureus and also for detecting the presence of Salmonella sp. Among the ice cream analyzed, 56.3% were unfit for consumption and between the creamy desserts, the percentage of unfit samples was 33.3%. Coagulase positive Staphylococcus and Salmonella were not found in the samples. It is then an inadequacy in handling and / or storage conditions in a considerable number of samples, indicating need for improvement in the conditions of preparation.

Keywords: microbiological quality, thermotolerant coliforms, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, contamination.

Introdução:

Os alimentos, na forma natural ou processados, podem veicular micro-organismos patogênicos, provocando infecções ou intoxicações nos consumidores, sendo que sua qualidade pode ser afetada por vários fatores, como a qualidade das matérias prima e o manuseio durante o preparo e o armazenamento (HANASHIRO et al., 2005; SOUZA et al., 2005).

Sobremesas, por incluir em seu preparo, leite, natas ou creme de leite não pasteurizados ou sem procedência, que podem estar contaminados, além de ovos crus, podem ser veículos de doenças de origem alimentar, causados por bactérias ou suas toxinas (ELEFTHERIADOU et al 2002).

Em muitos países, a maioria dos surtos de origem alimentar registrados são atribuídos a salmonelose, provocada pela *Salmonella* sp (RABSCH et al., 2001). De acordo com Scallan et al. (2011), 11% da estimativa de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos são devidas à essa bactéria, podendo causar hospitalizações e mortes.

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Infecções em humanos normalmente ocorrem pelo consumo de alimentos, sobretudo os de origem animal, como carne, aves, ovos, produtos lácteos e frutos do mar (TIRADO & SCHMIDT, 2001; YAN et al., 2003). A *Salmonella*, bem como outras bactérias entéricas, é transmitida pela via fecal oral (DOLEJSKÁ et al., 2009) e é capaz de crescer em temperaturas entre 8ºC a 45ºC, em pH que pode variar de 4 a 9 e em atividade de água maior que 0,94 (GUTHRIE, 1992). Os sintomas da salmonelose envolvem diarréia, vômito, dor abdominal e febre. Qualquer pessoa pode contrair salmonelose por meio de alimentos contaminados, porém a doença é mais grave em crianças, idosos e pessoas com o sistema inume debilitado (EL-GAZZAR & MARTH, 1992).

De acordo com Acco et al. (2003), a terceira causa mais comum de doenças de origem alimentar no mundo é causada por *Staphylococcus aureus*. A intoxicação alimentar estafilocócica é causada pela ingestão de enterotoxinas pré formadas, produzidas durante o crescimento da bactéria nos alimentos (SHIMIZU et al., 2000; JABLONSKI e BOHACH, 2001).

As primeiras enterotoxinas, conhecidas como clássicas, foram designadas de A a E (SEA até SEE), sendo codificadas pelos genes *sea* até *see* respectivamente (DINGES et al., 2000; BALABAN & RASOOLY, 2000; ALOUF & MULLER-ALOUF, 2003; LETERTRE et al., 2003; MEMPEL et al., 2003;), sendo os tipos A e D, os mais associados às intoxicações alimentares (PELISSER et al., 2009). As enterotoxinas são termoestáveis a 100ºC/30 minutos, o que significa que sua atividade biológica permanece inalterada mesmo após a maioria dos processamentos térmicos dos alimentos, sendo que elas também resistem à proteases gastrentestinais, como a pepsina (PELISSER et al., 2009). Apesar da pasteurização do leite eliminar células de *S. aureus*, as enterotoxinas termoestáveis mantém sua atividade biológica, o que as torna importantes na saúde pública e setores alimentares (BECKER et al., 2007). Os principais sintomas de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus* são os enjôos e vômito, que ocorrem entre uma a seis horas pós a ingestão do alimento contaminado, podendo ocorrer também diarréia e cólica abdominal (JABLONSKI & BOAHCH, 1997).

S. aureus habita frequentemente a nasofaringe do ser humano, podendo facilmente contaminar as mãos do homem, e consequentemente, os alimentos, causando a intoxicação alimentar estafilocócica, desde que se tenha condições adequadas de

tempo e temperatura (MURRAY et al., 2000). Dessa forma, o tratamento não adequado dos alimentos deve ser considerado com um risco contaminação, já que intoxicações alimentares por *S aureus* frequentemente são associados com alimentos altamente manipulados (CATTEAU, 1993).

Em função dos riscos microbiológicos a que estão submetidos os alimentos, mesmo levando-se em conta as técnicas de preservação disponíveis, a segurança microbiológica dos alimentos oferecidos no mercado ainda é umas das grandes preocupações de agências reguladoras de qualidade, de indústrias de alimentos e, sobretudo dos consumidores. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as condições higiênico sanitárias de amostras de sorvetes e sobremesas, comercializados na cidade de Botucatu, através da determinação de coliformes fecais e da pesquisa de patógenos, como *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus*, pesquisando também a produção de enterotoxinas clássicas pelas cepas de *Staphylococcus aureus*, já que os produtos analisados são à base de leite, matéria prima muito sujeita à contaminação.

Material e métodos:

Foram analisadas 70 amostras de sorvetes e sobremesas de padarias, lanchonetes, sorveterias, supermercados e *bombonieres* da cidade de Botucatu, SP, coletadas no período de abril a agosto de 2012.

Para a análise, 25g de cada amostra foram pesados e homogeneizados em 225 ml de água tamponada esterilizada, em sacos plásticos apropriados, os quais foram levados ao Stomacher Lab Blender 400 por trinta segundos. A partir desta diluição inicial de 10^{-1}, foram preparadas várias diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente.

Para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes (CT), volumes de 1 ml de cada diluição da amostra foram inoculados numa série de três tubos por diluição. Utilizou-se 10 ml de caldo Lauril e a incubação foi realizada a 35ºC/24-48 horas. Em seguida, para confirmação de CT, três alçadas de cada tubo positivo foram repicadas para o caldo EC e incubadas a 45ºC/24 horas. A leitura foi realizada e a partir da tabela do NMP e foram calculados os NMP de CT/grama de amostra analisada (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

Para enumeração dos estafilococos coagulase positiva, foi utilizado o método da semeadura em superfície em ágar Baird-Parker, suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo. Após incubação a 35ºC/48horas, foi realizada a contagem das

unidades formadoras de colônias (UFC) características. As colônias suspeitas foram isoladas em ágar TSA e submetidas ao teste da catalase e da coagulase (LANCETTE & BENNETT, 2001).

Para detecção da presença de *Salmonella* sp, 25g de cada amostra foram pesados e homogeneizados em 225 ml de água peptonada tamponada, em sacos plásticos apropriados, os quais foram levados ao Stomacher Lab Blender 400 por trinta segundos. O homogeneizado foi transferido para um frasco esterilizado e incubado a 35ºC/24 horas. Em seguida, 0,1ml foi transferido para o caldo Rapapport e 1 ml, para o caldo Tetrationato, com incubação a 42ºC e 35 ºC por 24 horas, respectivamente. Após esse período, uma alçada de cada tubo foi semeada em ágar XLD e ágar SS, incubados a 35ºC/24 horas. As colônias características foram isoladas em ágar TSA e submetidas a testes bioquímicos, como ágar Tríplice Açúcar Ferro, Fenilalanina e decarboxilação da Lisina. As cepas com o perfil de salmonela foram submetidas ao API 20 E (Biomeriéux) e a sorotipagem somática e flagelas (Probac), para confirmação de *Salmonella* sp (ANDREWS et al, 2001).

Resultados e dicussão:

Foram analisadas 16 amostras de sorvetes e 54 de sobremesas, no toal de 70, coletadas em padarias, lanchonetes, sorveterias, supermercados e bombonieres da cidade de Botucatu, SP.

De acordo com resolução da ANVISA, os padrões microbiológicos para sorvetes a base de leite exigem ausência de *Salmonella* em 25 gramas e toleram até 5 x 10 MNP de coliformes termotolerantes/g e até 5 x 10^2 UFC/g de estafilococos coagulase positiva. Ocorreu a ausência de *Salmonella sp*. e de quanto de *S. aureus* em todas as amostras pesquisadas. Já com relação ao número mais provável de CT, dentre os 16 sorvetes analisados, 9 (56,3%) das amostras estavam impróprias para o consumo, sendo que os respectivos valores dos mesmos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes nas amostras de sorvetes consideradas impróprias ao consumo, coletadas em sorveterias, na cidade de Botucatu, 2012.

Tipos de sorvete	NMP/g CT
Merengue	$4{,}6 \times 10^5$
Brigadeiro	$1{,}1 \times 10^6$
Ninho trufado	$4{,}6 \times 10^5$
Banana	$4{,}6 \times 10^5$
Morango	$9{,}3 \times 10^4$
Chocolate	$> 1{,}1 \times 10^6$
Chocolate	$1{,}1 \times 10^6$
Leite ninho	$> 1{,}1 \times 10^6$
Flocos	93

NMP/g CT: número mais provável de coliformes termotolerantes por grama

Com relação às sobremesas cremosas com ou sem recheio, a RDC n° 12 da ANVISA (BRASIL, 2001) exige ausência de *Salmonella* em 25 gramas e tolera até 10^2 MNP de coliformes termotolerantes/g e até 5×10^2 UFC/g de estafilococos coagulase positiva. A pesquisa por esses patógenos nas sobremesas também resultou em ausência de ambos em todas as amostras, assim como nos sorvetes. Com relação ao número mais provável de CT, dentre as 54 sobremesas analisadas, 18 (33,3%) das amostras estavam impróprias para o consumo e os respectivos valores de NMP/g determinados para tais amostras encontram-se na Tabela 2.

Em estudo também realizado em Botucatu, Aragon-Alegro et al (2006) observaram resultados semelhantes aos do presente trabalho, constatando que entre as sobremesas analisadas, 36,5% das amostras estavam impróprias para o consumo e, entre os sorvetes, 25%, número inferior ao do estudo atual. Já com relação à enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva, o estudo encontrou número superior, sendo este de 46,15% de amostras em desacordo com a lei entre as sobremesas e de 8,3% entre os sorvetes, utilizando-se a mesma legislação.

Tabela 2: Determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes nas amostras de sobremesas consideradas impróprias ao consumo, coletadas em docerias e padarias, na cidade de Botucatu, 2012.

Sobremesa	NMP/g CT
Torta de limão	$9,3 \times 10^4$
Torta de limão	$1,1 \times 10^6$
Torta de limão	$2,3 \times 10^4$
Bomba recheada	$1,1 \times 10^6$
Bomba de trufa	$> 1,1 \times 10^6$
Bomba de trufa	$> 1,1 \times 10^6$
Bomba recheada	$> 1,1 \times 10^6$
Bomba de chocolate	$2,3 \times 10^4$
Bomba de chocolate	$4,3 \times 10^4$
Bomba de chocolate	$4,3 \times 10^4$
Bomba de creme	$2,4 \times 10^5$
Bomba de creme	$4,6 \times 10^5$
Bomba de truta	$4,6 \times 10^5$
Bomba de truta	$4,3 \times 10^4$
Bomba de frutas	$2,4 \times 10^5$
Torta de morango	$9,3 \times 10^4$
Torta de morango	$4,3 \times 10^4$
Brigadeiro	$9,3 \times 10^4$

NMP/g CT: número mais provável de coliformes termotolerantes por grama

Em um estudo realizado em Tripoli, na Líbia, os resultados encontrados por El-Sharef et al (2006), em acordo com a legislação daquele país, foram inferiores ao do presente estudo em relação ao NMP de CT, apresentando apenas 6% das amostras analisadas impróprias para o consumo. Quanto a presença de *Salmonella* sp. e *S. aureus*, os resultados divergiram, sendo que para o primeiro patógeno, 5% das amostras eram positivas e para o segundo, a contaminação foi de 38%.

Kanbakan et al (2004), trabalhando com sorvetes vendidos em Denizli, Turquia, observaram que 25% das amostras apresentam CT acima do limite permitido pela legislação em vigor, enquanto Gündogan et al (2006), também analisando sorvetes na Turquia, isolaram *S. aureus* em 16 amostras (26,6%).

Eleftheriadou et al (2002), trabalhando na república do Chipre, analisaram 2.402 amostras de sobremesas, num período de 10 anos. Este estudo teve por resultado 3,2% de amostras com altos índices de contaminação pela presença de *E. coli*, 1,5% de

amostras positivas para *Salmonella* sp. e 6% de amostras com concentrações de *S. aureus* maiores que a permitida (10^4 UFC/g), revelando problemas significativos nas práticas de higiene, controle de temperatura e utilização de ingredientes crus, como frutas e nozes mal lavadas, as quais podem ter contribuído para tal resultado.

Os resultados apresentados indicaram concentrações de coliformes termotolerantes bastante acima do recomendado em número significativo de amostras, indicando condições higiênico sanitárias deficientes no preparo e/ou manutenção das sobremesas e sorvetes, as quais podem resultar em risco á saúde de seus consumidores. Por isso se faz necessário melhoras nas condições de fabricação dos alimentos, bem como na higiene dos manipuladores.

Referências:

ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUES, J. A. P.; TONDO, E. C. Identication of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v.20, p. 489–493, 2003.

ALOUF, J.E., MULLER-ALOUF, H., 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. **Int. J. Med. Microbiol**. 292, 240–429, 2003.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, J.S.; BAILEY, J.S. *Salmonella.* In:Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. **American Public Health Association.** Washington, 4th edition , p.357-380, 2001.

ARAGON-ALEGRO, L. C. KONTA, E. M. SUZUKI, K. RALL, V.L.M. Occurrence of coagulase-positive Staphylococcus in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from and isolated strains. **Food Control (In Press),** 2006.

BALABAN, N., & RASOOLY, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins**. International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1–10, 2000.

BECKER, H., BURK, C., MARTLBAUER, E., 2007. Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis. **J. Verbr. Lebensm**. 2, 171–189, 2007.

CATTEAU, M., 1993. Infections microbiennes d'origine alimentaire. Ann. Falsif. Expert. Chim. 86, 17–24, 1993.

DINGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLIEVERT, M., 2000. Exotoxins of Staphylococcus aureus. **Clin. Microbiol**. Rev. 13, 16–34, 2000.

DOLEJSKÁ, M., BIEROSOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, L., LITERÁK, I., & CÍZEK, A. (2009). Antibioticresistant Salmonella and Escherichia coli isolates with integrons and extendedspectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. **Journal of Applied Microbiology**, v.106(6), p.1941–1950, 2009.

ELEFTHERIADOU, M. VARNAVA-TELLO, A. METTA-LOIZIDOU, M. et al. The microbiological profile of foods in the Republic of Cyprus: 1991-2000. **Food Microbiol.,19**: 463-471, 2002.

EL-GAZZAR, E. F., & MARTH, E. H. (1992). Salomonellae, Salmonellosis, and dairy foods: A review. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 2327–2343, 1992.

EL-SHAREF, N, GHENGHESH, K. S. ABOGNAH, Y. S. et al. Bacteriological quality of ice cream in Tripoli—Libya. **Food Control., 17**: 637-641, 2006.

GÜNDOGAN , N. CITAK, S. TURAN, E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. **Food Control., 17**: 389-392, 2006.

GUTHRIE, R. K. (1992). Salmonella. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.

HANASHIRO, A.; MORITA, M.; MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; TORRES, E.A.F.S.; Microbiological quality of selected street foods from a restricted area of São Paulo city, Brazil. **Food Control,** v. 16, p. 439–444, 2005.

JABLONSKI, L. M., & BOHACH, G. A. (1997). Staphylococcus aureus. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), **Food microbiology: fundamentals and frontiers** (pp. 353–375). Washington: ASM Press, 1997.

JABLONSKI, L.M., BOHACH, G.A., 2001. Staphylococcus aureus, In: DOYLE, M.P.,

Kanbakan, U., C¸ on, A. H., & Ayar, A. Determination of microbiological contamination sources during ice cream production in Denizli, Turkey. **Food Control., 15**: 463–470, 2004.

KORNACKI, J.L.& JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In:Compendium of methods for the microbiological examination of foods. DOWNES, F.P.; ITO, K. **American Public Health Association,** Washington, 4th edition , p.69-82, 2001.

LANCETTE, G.A.& BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In:Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2001.

LETERTRE, C., PERELLE, S., DILASSER, F., FACH, P., 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of Staphylococcus aureus. **J. Appl. Microbiol**. v. 95, p. 38– 43, 2003.

MEMPEL, M., LINA, G., HOJKA, M., SCHNOPP, C., SEIDL, H.P., SCHAFER, T., RING, J., VANDENESCH, F., ABECK, D., 2003. High prevalence of superantigens associated with the egc locus in Staphylococcus aureus psolates from patients with atopic eczema. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**. 22, 306– 309, 2003.

MURRAY, K.; O´ROURKE, A.L.; MCLAY, J.; SIMMONDS, R. Use of ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O 157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. **International Journal of Food Microbiology,** v. 57, p.147-158, 2000.

PELISSER, M.R., KLEIN, C.S., ASCOLI, K.R., ZOTTI, T.R., ARISIL, A.C.M., 2009. Ocurrence of Staphylococcus aureus and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Braz. J. Microbiol**. 40, 145–148, 2009.

RABSCH, W., TSCHAPE, H., ANDREAS, J., & BAUMLER, A. J. (2001). Review, non-typhoidal salmonellosis: Emerging problems. **Microbes and Infection**, v.3, p.237–247, 2001.

SCALLAN, E., HOEKSTRA, R. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V., WIDDOWSON, M. A., ROY, S. L., et al. (2011). Foodborne illness acquired in the United Statesemajor pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17(1), p.7e15, 2011.

SHIMIZU, A., FUJITA, M., IGARASHI, H., TAKAGI, M., NAGASE, N., SASAKI, A., KAWANO, J., 2000. Characterisation of Staphylococcus aureus coagulase Type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980– 1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol**. 38, 3746–3749, 2000.

SOUZA, E. L. Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives**. Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 559-566, 2005.

TIRADO, C., & SCHMIDT, K. (2001). WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. World Health Organization. **Journal of Infection**, v.43(1), p.80e84, 2001.

YAN, S.S., PENDRAK, M.L., RIDDER, B.A., PUNDERSON, J.W., FEDORKO, D.P., FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews** 4 (2003) 189–204, 2003.