



QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E POTENCIAL TOXIGÊNICO DE FUNGOS ISOLADOS DE AMENDOIM COMERCIALIZADO EM ESTABELECIMENTOS DA REGIÃO DE CAMPINAS

Palavras-Chave: *Aspergillus*, *Salmonella*, DOENÇA TRANSMITIDA POR ALIMENTOS, MICOTOXINAS

Autores(as):

ANA BEATRIZ SCOMPARIN RIBEIRO, FEA – UNICAMP

RAFAELA MARTINS MORASI, FEA – UNICAMP

ERIK DA SILVA PEREIRA, FEA – UNICAMP

THAYNARA SOUZA SOTO, FEA – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). LILIANA OLIVEIRA ROCHA, FEA – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). NATHÁLIA CRISTINA CIRONE SILVA (orientador(a)), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO

Apesar de seu baixo custo e vantagens nutricionais, o amendoim também apresenta certa preocupação em relação às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), possuindo até surtos de *Salmonella* relatados. Além disso, os fungos da espécie *Aspergillus*, responsáveis por desenvolverem micotoxinas chamadas aflatoxinas, também têm sido observados. Essas micotoxinas, quando acumuladas no organismo, podem levar a câncer e outras doenças como cirrose hepática e necrose aguda. Tal toxina se desenvolve durante processamentos ou no armazenamento onde não há o cuidado devido. Além da *Salmonella* e da *Aspergillus*, outro microrganismo que também pode ser associado à leguminosa e inclusive ser utilizado como parâmetro de higiene, é a *Escherichia coli*, bactéria ubíqua e pertencente à família *Enterobacteriaceae*. O objetivo desse estudo será avaliar a qualidade higiênico-sanitária de amendoins comercializados na região de Campinas, e avaliar o potencial toxigênico dos *Aspergillus* isolados.

METODOLOGIA

Origem das amostras

Foram utilizadas 50 amostras de amendoim, podendo ser envasado ou a granel, adquiridas em mercados da região de Campinas.

Enumeração e isolamento de *E. coli* (APHA, 2001)

As amostras foram diluídas em água peptonada, sendo 25 gramas do alimento com 225mL do diluente. Foram realizadas diluições seriadas que foram inoculadas em ágar McCKonkey, sendo incubadas a 37°C por 18-24 horas em aerobiose. Foram selecionadas aleatoriamente até três colônias suspeitas (enegrecidas com brilho verde-metálico) por amostra e confirmadas por testes bioquímicos.

Enumeração de Enterobactérias

Para os testes de Enterobactérias foi realizado o método de plaqueamento em profundidade com Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG). Foram utilizadas as mesmas diluições que *E. coli* e as placas foram incubadas a 35°C/18 - 24 horas.

Deteção da presença de *Salmonella* (ANDREWS et al, 2001)

Para a detecção da presença de *Salmonella*, 25 gramas da amostra do alimento foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada tamponada, em um saco plástico no "Stomacher" durante dois minutos. Após esse período, o homogeneizado foi transferido a um Erlenmeyer e incubado a 35°C por 24 horas. A seguir, 1 mL foi semeado em um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetrionato com iodeto de potássio. O tubo foi incubado a 35°C por 24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL será transferida para um tubo com 10 mL de caldo Rappaporte-Vassiliadis e será incubado a 42°C por 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo será semeada em placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD), placas contendo ágar Hektoen Enteric Agar (HE) e placas contendo bismuth sulfite agar (BSA). Após incubação de 24 horas a 35°C, as colônias características de *Salmonella* foram isoladas e passaram por testes bioquímicos.

Contagem de bolores e leveduras (RYU & WOLF-foi, 2015)

Para a enumeração dos bolores e leveduras, será utilizado o método da semeadura em superfície, onde 0,1 mL das diversas diluições da amostra será depositado em placas de Petri com Ágar Dicloran Glicerol 18 (DG-18) e o inóculo foi espreado com o auxílio de alça de drigaski. As placas foram incubadas sem inverter no escuro. Após a incubação a 25°C por 5 dias foi realizada a contagem da placa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Escherichia coli*

Segundo a IN nº60, de 23 de dezembro de 2019, para a *Escherichia coli*, dentre 5 amostras do alimento analisado, duas unidades amostrais podem apresentar resultado intermediário, dado entre 10



Figura 1: Teste do indol positivo para *E. coli*

UFC por grama e 10^2 UFC por grama, e nenhuma unidade amostral pode apresentar resultado maior que 10^2 UFC por grama (ANVISA, 2019).

Após o isolamento de 2 colônias características por amostra, foram aplicados testes bioquímicos de citrato e Indol. Ao final dos testes, apenas 1 amostra positivou para *E. coli*, que será submetida à aos testes de Vermelho de Metila (VM) e de Vorges Proskauer (VP), para confirmação final.

A amostra positivada é de amendoim com casca, sem sal e cru, que não passou por tratamento térmico portanto. A contagem de colônias características de *E. coli* na amostra em questão foi de 3×10^4 UFC, acima da legislação.

5.2. Enterobactérias

Com relação as enterobactérias, não existem padrões de qualidade microbiológica estabelecidos pela ANVISA, entretanto, os resultados encontrados foram:

Tabela 2: Características e quantidade de colônias de enterobactérias das amostras

	UFC <10	UFC >10 ²
Total	24	26
A granel	9	11
Industrializada/envasada	15	15

A partir dos dados tabelados, podemos observar que 55% das amostras a granel apresentam $UFC > 10^2$, enquanto que para amostras industrializadas é de 50%. Com relação ao tratamento térmico, nas amostras onde não houve crescimento de colônias características ($UFC < 10$) não notou-se uma diferença, entretanto, 73,01% das amostras com $UFC > 10^2$

não sofreram tratamento térmico. A presença de casca e sal não demonstrou diferença nas amostras mais contaminadas, porém a ausência das mesmas foi maior nas amostras com menos colônias.

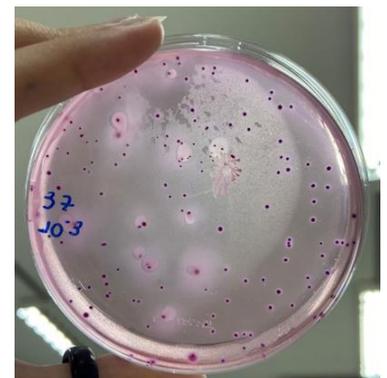


Figura 2: Colônias características de enterobactérias em meio VRBG

5.3. Salmonella

Com relação a *Salmonella*, nos meios XLD e HE não foram observadas colônias características, que crescem com uma coloração preta. No meio BSA, foi observado crescimento característico, tanto na solução de tetratonato como na solução de Rappaport. Foram isoladas 3 colônias características do meio para a realização de testes bioquímicos, que deram negativos para presença de *Salmonella*.

5.4. Bolores e Leveduras

Tabela 3: Características e qualidade das amostras com relação a presença de bolores e leveduras			
	Número de amostras com qualidade aceitável	Número de amostras com qualidade intermediária	Número de amostras com qualidade inaceitável
Total	42	7	1
A granel	17	2	1
Industrializada/ envasada	25	5	0

intermediária e 5% qualidade inaceitável, enquanto que para as amostras de origem industrializada, 83,33% das amostras tiveram uma qualidade aceitável, e os outros 16,67% uma qualidade intermediária. Quanto ao tratamento térmico, 57,14% das amostras aceitáveis não passaram por um, porém 85,71% das amostras intermediárias também não passaram por um, assim como 100% das amostras inaceitáveis. Quanto à presença da casca, ela foi menor nas amostras aceitáveis e maior nas amostras de qualidade intermediária e inaceitável, ao contrário do sal, que esteve mais presente nas amostras aceitáveis e menos nas amostras intermediárias e inaceitáveis.



Figura 4: Hifa característica de *Aspergillus* em microscópio

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos observar que todas as amostras foram aceitáveis quando o parâmetro observado foi a *Salmonella* e apenas uma amostra apresentou *E. coli* fora dos

Conforme a IN nº60, de 23 de dezembro de 2019, para a bolores e leveduras, dentre 5 amostras do alimento analisado, apenas uma amostra pode apresentar resultado intermediário, que se dá entre 5×10^2 UFC por grama e 10^4 UFC por grama, e nenhuma unidade amostral pode apresentar resultado maior que 10^4 UFC por grama (ANVISA, 2019). Sendo assim, obtivemos os seguintes resultados ao lado.

Pela tabela, podemos observar que 85% das amostras a granel possuem qualidade aceitável, 10% qualidade



Figura 3: Colônias de bolores em meio DG18

Nesta análise, observamos que a maior quantidade de colônias encontradas foi em uma amostra a granel, de amendoim com casca e sem sal, sendo a quantidade igual a 42. A segunda maior quantidade de colônias, 31, foi encontrada numa amostra industrializada, de amendoim com casca e sem sal. A partir de então, as próximas quantidades de colônias são bem menores, indo de 11 a 0.

parâmetros aceitáveis de qualidade. Na família *Enterobacteriaceae*, um amendoim mais seguro pode indicar uma melhor qualidade higiênica e ser menos provável de causar infecções gastrointestinais (ICMSF, 2011).

Quanto aos bolores e leveduras, baseado nos resultados obtidos, 5% estão inaceitáveis e 10% em limite intermediário, chamando a atenção para as condições higiênicas e de armazenamento do produto.

BIBLIOGRAFIA

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.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Brasil: Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Acesso em 8.02.2023. Disponível em <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/202004/17093620-in-anvisa-60-2019.pdf>

APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods (Fourth edition), American Public Health Association, Washington, DC (2001).

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Food. Microorganisms in foods 8: Use of data for assessing process control and product acceptance.

RYU, D & WOLF-HALL, C. Yeasts and molds. In: SALFINGER, Y & TORTORELLO, M.L. (eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5m Ed American Public Health Association, Washington, D. C., 2015 Chapter 2 1, pp.277-286.