

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - ICET  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA**

**JANAINA DA FONSECA VIANA**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS  
EM DIFERENTES SUPERMERCADOS DE ITACOATIARA – AM**

**ITACOATIARA-AM**

**2023**

JANAINA DA FONSECA VIANA

**Avaliação da qualidade de vegetais minimamente processados em diferentes  
supermercados de Itacoatiara – AM**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Engenharia Sanitária.

Orientador: Prof. Rodrigo Couto Alves  
Coorientador: Profa. Rhanna V. A. da Silva

ITACOATIARA-AM

2023

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V614a Viana, Janaina da Fonseca  
Avaliação da qualidade de vegetais minimamente processados em diferentes supermercados de Itacoatiara – AM. / Janaina da Fonseca Viana . 2023  
49 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rodrigo Couto Alves  
Coorientadora: Rhana Victória Amaral da Silva  
TCC de Graduação (Engenharia Sanitária) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Alimentos. 2. minimamente processados. 3. contaminação. 4. microrganismos. I. Alves, Rodrigo Couto. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JANAINA DA FONSECA VIANA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS  
EM DIFERENTES SUPERMERCADOS DE ITACOATIARA - AM**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Engenharia Sanitária.

Aprovado ( X ) Reprovado ( ) em: 28/ 06 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Rodrigo Couto Alves  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof. Jean Michel dos Santos Menezes  
Universidade Federal do Amazonas

---

Profa. Gleice Rodrigues de Souza  
Universidade Federal do Amazonas

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradecer a Deus por todo cuidado com a minha vida durante a graduação, por nunca me desamparar nos momentos difíceis, e me proporcionar saúde e disposição para concluir a graduação.

Aos meu pais, Ricarlos Freitas Viana e Raimunda Damiana da Fonseca Viana, que nunca mediram esforços para me manter na universidade, serem meu apoio em todas as situações difíceis e compreenderem a minha ausência enquanto me dedicava aos meus estudos. Sem vocês ao meu lado esse sonho não seria possível. Agradeço aos meus irmãos, Joice Viana que me incentivou a não desistir de ir para Itacoatiara cursar Engenharia, a minha irmã Lais Viana, que foi a que mais me apoiou emocionalmente nos dias difíceis e que celebrava todas as minhas conquistas, e ao meu irmão Lucas Viana que foi meu incentivador e também não mediu esforços para me manter em Itacoatiara.

Agradeço ao meu namorado, Carlos Henrique Gomes, por toda paciência quando os dias de prova me deixavam exausta e demandavam mais de mim psicologicamente, por ser meu apoio emocional nas crises de ansiedade e também cuidar da minha saúde física e mental.

Agradeço aos meus amigos, Milene Profiro que foi a minha primeira amiga de graduação, e que sempre acreditou no meu sonho de ser Engenheira Sanitarista. Agradeço a minha amiga Camila Amorim, por toda parceria durante os últimos períodos, por me incentivar, cuidar de mim, chorar nos momentos difíceis e celebrar os felizes. Ao meus amigos Leonora Brasil, Rosália Macedo, Felipe Uchoa, Nagila Chagas, Manoel Neto, Felipe Magalhães e Anderson Vieira por me incentivarem e serem ombros amigos nos momentos difíceis e felizes.

Agradeço aos meus professores, pelas correções e ensinamentos, em especial aos meus orientadores Rodrigo Couto e Rhanna Silva, aos meus queridos professores, Anderson Lincoln e Jean Michel, gratidão. Agradeço também a minha instituição por ter me dado todas as ferramentas que permitiram finalizar a graduação.

Agradeço a todos que me incentivaram durante toda a minha graduação, esse sonho nunca foi vivido sozinho, e a minha conquista também é de todos vocês. Gratidão.

## RESUMO

Na expectativa de otimizar o tempo de preparo das refeições devido as rotinas cada vez mais intensas, houve um aumento na busca por alimentos minimamente processados, em virtude de dispor de toda a facilidade de um produto nutritivo e prático. O objetivo desse trabalho foi avaliar se há presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários nas amostras de alimentos adquiridos em dois supermercados do município de Itacoatiara - AM. Foram analisadas 2 amostras de vegetais minimamente processados, com o intuito avaliar se algumas das amostras ou ambas tinham alguma presença de microrganismos contaminantes as amostras foram coletadas e levadas ao laboratório de farmácia do ICET, onde foram feitas análises microbiológicas através da técnica de diluição seriada em tubos múltiplos, para os microrganismos de interesse: coliformes totais e termotolerantes, e *Escherichia coli*. Após constatar contaminação, foi feito a coloração de Gram, que permitiu através da visualização microscopia das lâminas a caracterização e classificação inicial das bactérias. Com a execução do presente trabalho, determinou a presença contaminantes microbiológicos nas amostras dos vegetais minimamente processados, considerando resultado positivo para os frascos em que houve a formação de gás no interior do tubo de Duhran ou reação química, no teste quando semeados em caldo LSB, EC e VB. Outro teste qualitativo foi feito utilizando as placas de petri, utilizando o ágar MacConkey foi encontrada a espécie *Escherichia coli* nas amostras "A" e "B, o resultado positivo se deu em virtude de as bactérias Gram negativas produzirem colônias com coloração rosa, pois são formadoras por bactérias fermentadoras de lactose.

**Palavra-chave:** alimentos; minimamente processados; contaminação; microrganismos.

## **ABSTRACT**

In the hope of optimizing meal preparation time due to increasingly intense routines, there has been an increase in the search for minimally processed foods, due to having all the ease of a nutritious and practical product. The objective of this work was to evaluate whether there is the presence of hygienic-sanitary indicator microorganisms in food samples purchased in two supermarkets in the city of Itacoatiara - AM. Two samples of minimally processed vegetables were analyzed, with the aim of evaluating whether some of the samples or both had any presence of contaminating microorganisms. The samples were collected and taken to the ICET pharmacy laboratory, where microbiological analyzes were carried out using the serial dilution technique in multiple tubes, for the microorganisms of interest: total and thermotolerant coliforms, and *Escherichia coli*. After verifying contamination, Gram staining was performed, which allowed the characterization and initial classification of bacteria through microscopy visualization of the slides. With the execution of the present work, it determined the presence of microbiological contaminants in the samples of minimally processed vegetables, considering a positive result for the flasks in which there was gas formation inside the Durham tube or chemical reaction, in the test when sown in LSB broth, EC and VB. Another qualitative test was carried out using petri plates, using MacConkey agar, the species *Escherichia coli* was found in samples "A" and "B", the positive result was due to the fact that Gram negative bacteria produce colonies with a pink color, as they are formed by lactose-fermenting bacteria.

**Keyword:** Foods; minimally processed; contamination; microorganism.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>8</b>
2.1 VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS .....	8
2.2. CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS .....	10
2.3 MICRORGANISMOS INDICADORES .....	11
2.3.1 COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES, ESCHERICHIA COLI .....	13
2.3.1.1 Coliformes totais.....	13
2.3.1.2 Coliformes termotolerantes .....	14
2.3.1.3 Escherichia coli.....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	16
3.2 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA .....	17
3.3 PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS .....	17
3.3.1 Aquisição e transporte das amostras .....	18
3.3.2 Recepção de amostra para análise .....	19
3.3.3 Processamento mínimo .....	19
3.3.4 Análise microbiológicas .....	19
3.3.4.1 Identificação de coliformes totais e termotolerantes .....	21
3.3.4.1.1 Teste Presuntivo .....	21
3.3.4.1.2 Teste confirmativo para coliformes totais .....	22
3.3.4.1.3 Teste confirmativo para coliformes termotolerantes.....	23
3.3.4.2 Identificação de Escherichia coli .....	25
3.3.5 Coloração de Gram .....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
4.1 OBSERVAÇÃO DAS EMBALAGENS DAS AMOSTRAS .....	30
4.2 COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES TERMOTOLERANTES .....	31
4.3 ESCHERICHIA COLI .....	34
4.4 COLORAÇÃO DE GRAM .....	38
4.4.1 Amostra "A" .....	39
4.4.2 Amostra "B".....	40
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A preferência por alimentos que tornem o dia a dia da população mais prático está ligada à falta de tempo devido a rotinas intensas de trabalho, estudos, e a busca por uma alimentação mais saudável e variada, entre outras atividades, tornando a compra dos alimentos minimamente processados (AMPs) uma alternativa válida na escolha da população. (GERMANO;GERMANO,2019).

Pensando nessas mudanças de rotina alimentar, foi publicado em 2014 o Guia Alimentar para a População Brasileira, o qual define os Alimentos Minimamente Processados (AMPs) como sendo provenientes de alimentos *in natura*, contudo, sofrendo processos mínimos, sem agregação de substâncias ao alimento. Os AMPs, oferecem uma variedade de atributos, como aparência, textura, sabor e aroma, além de aspectos nutricionais e de segurança por ser um alimento semelhante ao fresco (PILON, 2017).

Com essa padronização os AMPs precisam passar por várias etapas de processamento, para um controle efetivo de agentes contaminantes e assegurar sua qualidade. Apresentam diversos fatores relacionados a fase de manipulação e conservações, onde a princípio a qualidade da água é um ponto crucial para que as etapas de limpeza e desinfecção sejam efetivas (MARTINS *et al.*, 2020).

Deste modo a limpeza correta dos utensílios, do local de manipulação, e a higiene pessoal dos manipuladores são aspectos fundamentais no controle de qualidade de microrganismos em alimentos (OLIVEIRA, SANTOS, 2015), pois na ausência de um protocolo de boas práticas de manipulação, pode-se ocorrer a contaminação do alimento por patógenos, que podem causar as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) a partir da sua ingestão.

A partir da contaminação destes alimentos, as DTA's podem ser provocadas por toxinas, bactérias, vírus, parasitas e substâncias tóxicas, podendo resultar em infecções, intoxicações e toxinfecções. Tendo em vista que os principais agentes etiológicos de toxinfecções alimentares são a *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, envolvendo cerca de 50% dos surtos diagnosticados, e em ordem de importância, seguem o *Bacillus cereus* e a *Escherichia coli*. (BRASIL, 2001; BRASIL, 2010).

Diante disso no Brasil, a comercialização dos AMP teve um aumento da demanda destes produtos a partir dos anos 90, mostrando a necessidade das empresas se adequarem a esse novo tipo de comércio (NASCIMENTO, 2019). Contudo, as condições higiênico-sanitárias do manipulador, dos equipamentos, utensílios podem comprometer a vida útil do AMPs, causando assim grande impacto econômico, e tornando controle de qualidade destes produtos uma necessidade eminente (VANETTI, 2004).

É pensando nos impactos causados pela contaminação de alimentos a saúde da população, que se faz necessária a investigação da qualidade destes alimentos e a indicação de ações de controle e vigilância de produtos alimentícios em supermercados, além de propor medidas profiláticas de contaminação e infecção.

Com a realização deste estudo procura-se obter dados qualitativos e quantitativos para apresentar como pesquisa científica para fins acadêmicos, incentivando a investigação de novos projetos relacionados a área de vigilância sanitária dos alimentos. Além de contribuir com informações que possam auxiliar os órgãos da vigilância sanitária quanto a fiscalização dos processos de manipulação e armazenamento.

O presente trabalho visou avaliar a qualidade dos vegetais minimamente processados comercializados em dois supermercados de Itacoatiara - AM por meio de metodologias convencionais e analisando a presença de microrganismo. Tendo em vista, a instrução normativa - in nº 161, de 1º de julho de 2022, os microrganismos que devem ser analisados nesse tipo de alimento são a Salmonella e Escherichia coli. Portanto, o presente trabalho restringiu-se a analisar somente Escherichia coli, em virtude das limitações dos laboratórios, e para a obtenção de dados adicionais sobre a adequação dos processos produtivos e a inocuidade do alimento, fez-se a análise de coliformes totais e termotolerantes (RDC 724,2022).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A classificação dos alimentos é baseada no tipo de processamento empregado em sua produção: in natura, minimamente processados e processados.

Na revisão bibliográfica foram abordados os temas, vegetais minimamente processados, onde focou-se em falar sua origem e comercialização, em seguida falou-se sobre contaminação dos alimentos, e os males que ela pode trazer para a saúde da população. Discorreu-se em seguida sobre microrganismos indicadores, com o foco em Coliformes totais e termotolerantes, e *Escherichia coli*.

### 2.1 VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS

Na busca constante por um estilo de vida mais saudável, a população tem recorrido a mudanças nos hábitos alimentares, evitando cada vez mais os alimentos processados e ultra processados, optando em contrapartida por alimentos com alto índice de valor nutricional e de fácil preparo (MARTINS *et al.*, 2020). Contudo, em virtude da rotina da população, a busca de alternativas que facilitem o dia-a-dia, faz com que estratégias comerciais sejam adquiridas.

Diante deste cenário, surgem os alimentos minimamente processados e com eles, toda a praticidade e facilidade que o consumidor procura, pois são alimentos que passam por processos, como remoção de partes não comestíveis e/ou indesejadas, acondicionamento em embalagens a vácuo entre outros processos que não envolvam adição de substâncias como sal e gorduras, e minimizem o tempo de preparo e consumo (MONTEIRO *et al.*, 2016).

Contudo, os supermercados são os principais locais de distribuição dos AMPs, observa-se que um grande número de alimentos manipulados nestes estabelecimentos não seguem adequadamente todas estas etapas de processamento, devido os altos índices de contaminação, como pode ser visto no Brasil, de acordo com dados da SVS, DE 2007 a 2016, o qual foram registrados 6.632 surtos, com uma faixa de 38,9% dos casos na região Norte (GERMANO; GERMANO,2019).

Pensando nessa perspectiva, frutas e hortaliças são consumidas diariamente e se fazem presentes na dieta do brasileiro, o que beneficia o desenvolvimento do agronegócio. A venda de frutas e hortaliças é um trabalho que vem crescendo nos últimos anos, em virtude disso, o ramo dos alimentos minimamente processados vem seguindo o ritmo de desenvolvimento (DO NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Para tanto, processamento mínimo é estabelecido como toda alteração física, provocada em frutos ou hortaliças, mas que mantém a qualidade nutricional, microbiológica e sensorial do produto fresco (CENCI, 2011). Tem por finalidade possibilitar ao consumidor um produto prático e vantajoso, que tenham características inalteradas de frescor, e que mantenham a qualidade sensorial de forma a garantir a segurança dos mesmos no que se refere a saúde pública (GIANNONI *et al.*, 2021).

Em contrapartida, o processamento mínimo pode causar a quebra de enzimas e substratos provocando o aumento das atividades enzimáticas encarregadas pela oxidação e no desenvolvimento de sabores e odores ruins da taxa respiratória, da evolução de etileno e de compostos fenólicos solúveis e totais (SANCHES *et al.*, 2017).

Diante disso, os AMP, possuem vida útil reduzida, devidos aos processos de corte e manipulação, de acordo com Chakraborty, Rao e Mishra (2015), o acelerado escurecimento da polpa, é ocasionado pela produção de polímeros de coloração marrom e melaninas, provenientes de reações catalisadas por enzimas, como a *peroxidase* e a *polifenoloxidase*.

Em virtude da necessidade, os AMMP são subordinados a vários processos antes da comercialização. Entre os quais, estão a seleção, higienização, pré-lavagem, sanitização, enxágue e corte. Concluídos todos estes procedimentos, o alimento deve ser embalado em recipientes seguros, e mantidos em refrigeração. Por último, acontece a distribuição do alimento até que chegue ao consumidor final (GUERRA *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2016).

Se fazem necessários os procedimentos de pré-preparo e preparo (seleção, higienização, sanitização e enxágue, corte e embalagem), afim de garantir a segurança do alimento, levando em consideração que as frutas, hortaliças e vegetais podem ser transportes de microrganismos em razão a

exposição destes alimentos após a colheita, no processo de distribuição por fornecedores e armazenamento. As saladas MMP tem tendências a serem consumidas cruas e existindo a presença de microrganismos patogênicos, são capazes de acarretar ao consumidor toxinfecções e intoxicações alimentares (MARCHI et al., 2011; LEAO, 2018).

Na Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022 que estabelece padrões microbiológicos para alimentos, as saladas minimamente processadas contendo abóbora, se enquadra no grupo de alimentos definidos como “alimentos preparados prontos para o consumo”, na categoria específica de “alimentos preparados prontos para o consumo contendo exclusivamente produtos de origem vegetal, elaborados sem emprego de calor” onde são estabelecidas a tolerância máxima permitida para *Escherichia coli*/g e a determinação de ausência de *Salmonella*/25g (BRASIL, 2023).

Moretti (2007) afirma que nos AMP a ocorrência de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes pode prejudicar a saúde do consumidor ou a qualidade do alimento. Para evitar essas situações, é preciso ter o cuidado de aplicar as boas práticas em todas as etapas de produção.

## 2.2. CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS

A preparação de um alimento livre de perigos pode ser comprometida em todas as etapas de produção. Desde as etapas de extração da matéria-prima, distribuição e armazenamento até as etapas finais de manipulação, preparo e consumo, em decorrência, principalmente, por riscos físicos, como pedras e pregos, riscos químicos, como venenos, ou riscos biológicos, caracterizados pelos microrganismos (FORSYTHE, 2013; CUNHA; AMICHI, 2014).

Diante disso, estando sujeitos a natureza, concentração, intensidade e fator de exposição, estes riscos são capazes de conduzir a ocorrência de Doenças Transmitidas pelos Alimentos (DTAs), ocasionadas a partir do consumo de alimentos e/ou água contaminados, que configuram ameaças à saúde do consumidor (SILVA JUNIOR, 1995; BALCHIUNAS, 2014; ABERC, 2015; BRINQUES, 2015).

Da mesma forma, os índices de surtos alimentares que acontecem, frequentemente ultrapassam o número de notificações, tendo em vista que, as

pessoas em sua grande maioria, não relacionam os sintomas ao consumo de alimentos contaminados, ou não procuram assistência médica. Ao mais, é corriqueiro o preenchimento incorreto de fichas de notificações de surtos alimentares por agentes sanitários (GOULART; LACERDA; DIAS, 2016).

Por outro lado, a manipulação é uma das principais origens de contaminação dos alimentos, pois através dela permite a propagação de agentes biológicos que causam danos à saúde, devido, principalmente omissão ou falha no processo de higienização do manipulador, adicionados a condições e locais inapropriados. CUNHA; AMICHI, 2014).

Por certo, o efeito de lavar a mãos de modo correto é a técnica mais eficaz existente para reduzir a contaminação dos alimentos pelos microrganismos, com a eliminação desses agentes biológicos (BELELA-ANACLETO,2016). De acordo com a RDC N° 216/2004, os manipuladores de alimentos devem higienizar as mãos ao chegar ao trabalho, antes e após a manipulação, após usar os banheiros e sempre que houver necessidade. Para mais, necessitam ser executadas, de forma regular, análises microbiológicas, tanto dos manipuladores de alimentos quanto dos locais em que os mesmos são produzidos, com a finalidade de determinar padrões de controle higiênico-sanitários nos serviços de alimentação e nutrição (SCHUMANN *et al.*, 2017).

### 2.3 MICRORGANISMOS INDICADORES

A presença de microrganismo em alimentos nem sempre está associada a qualidade do produto, uma vez que uma pequena porcentagem dos microrganismos existentes são causadores de doença. Algumas bactérias e fungos são importantes aliados no processo industrial de produção de alimentos e bebidas. Quando identificado a presença de microrganismos em alimentos, não podemos dizer que tal trará malefícios para o consumidor, ou que esse alimento seja de baixa qualidade.

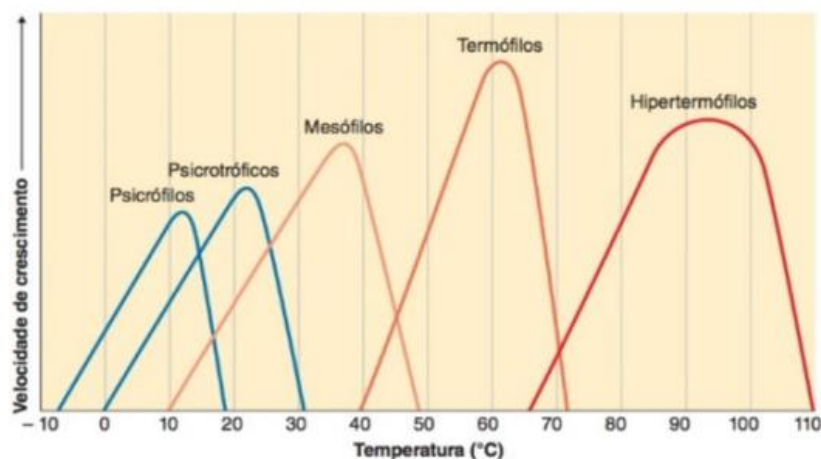
Excluindo os poucos produtos que são submetidos à esterilização comercial, os alimentos em sua grande maioria podem conter bolores, leveduras, bactérias e outros microrganismos. Esses alimentos tornam-se perigosos para consumo, quando seus princípios de sanitização e higiene não são cumpridos (SILVA,2002). Caso o alimento permaneça exposto a condições que permitiria a entrada e/ou crescimento de agentes infecciosos ou toxigênicos, pode ser

considerado que o mesmo se torne um veículo de transmissão de doenças (ICMSF,1984).

Segundo Tortora, Funke e Case (2017), os microrganismos são divididos pelas suas especificidades quanto a temperaturas, pois para atingir o crescimento de valores ótimos, os psicrófilos devem está em torno de -10 a 20°C), já os mesófilos por volta de 10 a 50°C), e por fim os termófilos 40 a 70°C).

Na Figura 1 pode-se observar isso o crescimento dos microrganismos em resposta a temperatura.

**Figura 01.** Crescimento de diferentes microrganismos



**Fonte:** Tortora, Funke e Case (2017).

Segundo Franco (2005), microrganismos indicadores são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável variável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

A ICMSF (*International Commison on Microbiological Specifications fot Foods*), classifica os microrganismos indicadores como:

1. Microrganismos que não oferecem risco direto à saúde: contagem padrão de *mésofilos*, contagem de *psicrotróficos* e *termófilos*, contagem de bolores e leveduras.
2. Microrganismos que oferecem risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes fecais, esterobactérias totais, *Escherichia coli*.

Diante disso, a prática de analisar nos alimentos microrganismos indicadores, tem-se tornado cada vez mais comum, tendo em vista o alto índice de contaminação. No Brasil, de acordo com dados da SVS, DE 2007 a 2016, foram registrados 6.632 surtos, e que 13,2% aconteceram na região Centro Oeste e Norte, e que os local de ocorrência com maior índice, foi nas próprias residências, com uma faixa de 38,9% dos casos. Quando isolados os agentes etiológicos, revelou-se uma incidência que de 7,5% das ocorrências foram por *Salmonella ssp.*, *Escherichia coli* (7,2%), *Staphylococcus aureus* (5,8%), *Bacillus cereus* (2,6%), e *Coliformes* (1,8%)(GERMANO; GERMANO,2019).

### **2.3.1 Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli***

Várias técnicas têm sido utilizadas para identificar coliformes, a fermentação da lactose é um meio e o primeiro requerimento para um microrganismo ser considerado um coliforme. A *Food and Drug Administrations*, sugere o uso do método Contagens de microrganismos pelo Número Mais Provável (NMP), o qual permite avaliar estatisticamente a quantidade de microrganismos presentes em uma amostra e estimar a proporção viável metabolicamente ativa, pela inoculação de tubos com caldo *Lauri Sulfato Triptose* (LST), sendo esta técnica mais utilizada para contagem de bactérias do grupo coliforme. A análise dos resultados dá-se via uso de uma tabela de NPM com intervalo de confiança de 95% de probabilidade, para as variadas combinações de tubos positivos nas séries de três ou cinco tubos (BANWART,1998; SILVA *et al.*,1997).

Desta feita, coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*, são definidos por três passos sucessivos na metodologia determinativa (ICMSF,1984).

#### **2.3.1.1 Coliformes totais**

Fazem parte deste grupo os gêneros bacterianos *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, abrangendo por volta de 20 espécies, dentre as quais tendo origem do trato intestinal de humano e outros animais de sangue quente, como também de vários gênero e espécies de bactérias não



entéricas. Portanto, sua presença em meio aquoso e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, tendo em vista a enumeração de *coliformes fecais* ou *E. coli* (SILVA *et al.*,1997).

Diante disso, a fundamental razão para que sejam agrupadas, se dar por suas muitas características comuns. Todas são Gram negativos, não formadores de esporos, em sua grande maioria se comportam como motéis, anaeróbios facultativos, resistentes a vários agentes surfactantes e fermentam lactose produzindo ácido e gás em 48h a 32° (leite) ou 35-37°C (RAY,1996).

#### 2.3.1.2 Coliformes termotolerantes

A mesma definição pode ser empregada para coliformes termotolerantes, mas, restringindo-se aos membros capazes de fermentar lactose com produção de gás em 24-48h a 44,5-45,5°C; (SILVA *et al.*,1997; SIQUEIRA,1995).

Em virtude da necessidade,está análise é realizada, buscando-se a determinação de coliformes de origem gastrintestinal, contudo sabe-se que cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* incluídas neste grupo podem apresentar origem não fecal, podendo ser elas de origem da água, solo e vegetais (SILVA,2002).

#### 2.3.1.3 Escherichia coli

A *E. coli* faz parte da família *Enterobacteriaceae*, gênero bacteriano com apenas uma espécie, e com cerca de mil tipos antigênicos, é encontrada normalmente nos intestinos dos animais e do homem, representa 80% da flora intestinal aeróbia , sendo excretada nas fezes , o que propicia a contaminação do solo e das águas (GERMANO; GERMANO,2019).

Contudo, tem como característica ser uma enterobactéria Gram-negativa, catalase positiva e oxidase negativa não esporogênica. É um mesófilo singular apto para se desenvolver entre uma temperatura de 7 e 46°C, sendo 37° a temperatura excelente, apesar que existam cepas que possam se multiplicar em 4°C (GERMANO; GERMANO,2019).

Eventualmente, quando encontrada em alimentos crus, é considerada um fator de contaminação fecal, podendo ser direta ou indireta. A contaminação

direta acontece durante o preparo de matérias-primas de origem animal e devido a falta de higiene pessoal dos manipuladores, já a contaminação indireta ocorre através de águas poluídas e de esgoto. Em alimentos que passam por tratamentos térmicos, a presença de E. coli é vista com grande preocupação (RAY,1996).

Por outro lado, legumes e hortaliças minimamente processadas são procurados em virtude da sua praticidade para o preparo e pela necessidade de se adotar uma alimentação mais saudável por parte da população, contudo a os coliformes termotolerantes e E. coli são patógenos comuns nesses alimentos, provocando alterações sensoriais , por causa das elevadas contagens microbianas, afetando a qualidade nutricional dos vegetais (GERMANO; GERMANO,2019).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

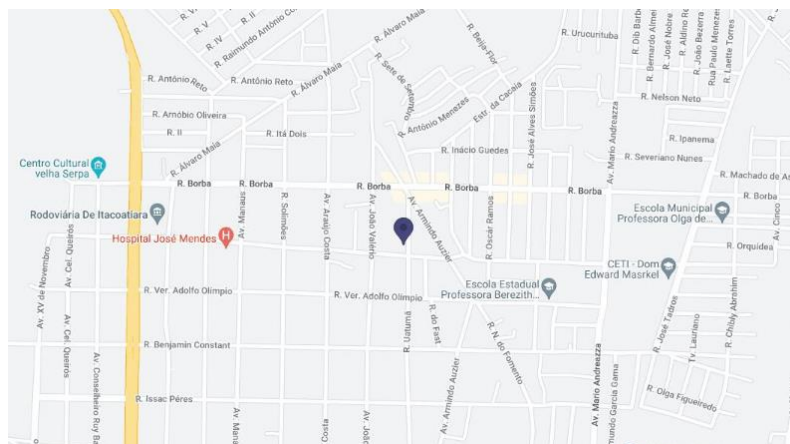
#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O município de Itacoatiara, fica localizado na região metropolitana de Manaus, no estado Amazonas, a uma distância aproximada de 175 km da Capital Manaus, com população estimada no ano de 2021 de 104.046 pessoas, abrangendo uma área da unidade territorial de 8.892 km<sup>2</sup> (IBGE,2023).

No presente estudo foram colhidas amostras de dois supermercados, que foram codificadas como supermercado “A” e supermercado “B”.

O supermercado “A”, fica localizado no bairro Araújo Costa. Esse estabelecimento recebe um grande movimento de pessoas que aproveitam os produtos alimentícios com um dos melhores preços da cidade, e promoções que acontecem constantemente, principalmente nos finais de semana.

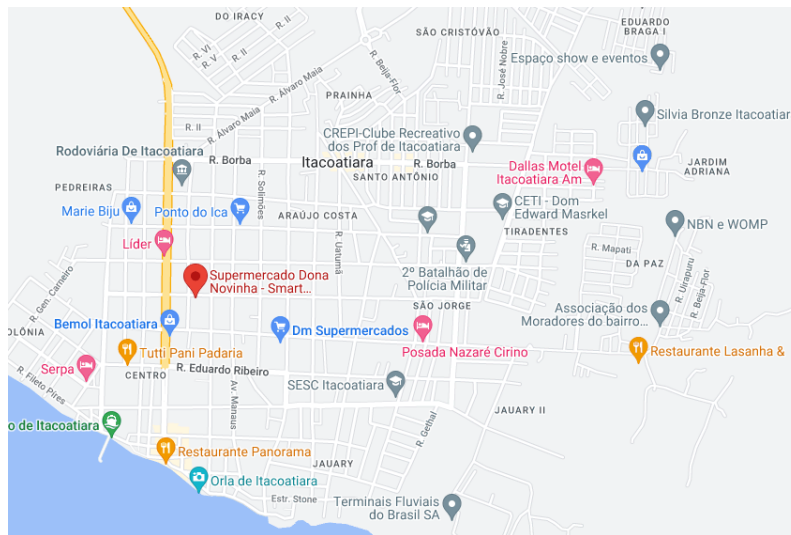
**Figura 02.** Localização do supermercado “A”



**Fonte:** Google Maps, 2023.

O supermercado “B”, fica localizado no bairro Centro. Esse estabelecimento recebe um grande movimento de pessoas devido sua localização ser central, e a facilidade nos pagamentos com o crediário da loja. O supermercado “B” é um dos maiores do município, sendo fundado em 2013, atuando há quase 10 anos no ramo alimentício.

**Figura 03:** Localização do supermercado “B”



**Fonte:** Google Maps, 2023.

### 3.2 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA

A metodologia de pesquisa utilizada neste trabalho é fundamentada em uma abordagem observacional com caráter descritivo. A pesquisa observacional consiste na coleta de informações a partir da aquisição dos vegetais minimamente processados para obtenção de dados científico ao presente trabalho. A pesquisa observacional transversal, que visa registrar informações sobre as amostras sem manipular ou interferir em seu ambiente, e comprar as diferentes amostras a fim de avaliar a existência de microrganismos presentes em cada uma delas. Todas as amostras serão adquiridas nos supermercados do município de Itacoatiara – AM, onde serão analisadas (ZANGIROLAMI-RAIMUNDO,2018).

### 3.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Somente as características sensoriais não determinam se um alimento irá ou não causar uma doença alimentar, pois existem microrganismos deteriorantes que podem estragar o alimento tornando impróprio ao consumo e microrganismos patogênicos que não alteram o alimento, porém podem causar doenças (ARAÚJO, MACHADO e MOLIN, 2016).

Com o intuito de se fazer uma análise mais detalhada das amostras “A” e “B”, e confirmar se algumas delas ou ambas tinham alguma fonte de contaminação, as amostras foram coletadas e levadas ao laboratório de farmácia do ICET, onde foram feitas análises microbiológicas para coliformes totais, termotolerantes, e Escherichia coli. Após confirmação, foi feito a coloração de Gram, que permitiu a identificação das estruturas.

### 3.3.1 Aquisição e transporte das amostras

Foram coletadas duas amostras de abobora em saladas de vegetais minimamente processados em dois supermercados do município de Itacoatiara-AM. Os vegetais minimamente processados foram sujeitos a análise por metodologias convencionais, e foram realizadas três repetições analíticas para cada alimento, totalizando 6 amostras de alimentos analisados, a amostra “A” foi adquirida no supermercado “A”, a amostra “B” foi adquirida no supermercado B”.

**Figura 04.** Amostra “A”



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

**Figura 05.** Amostra “B”



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

### **3.3.2 Recepção de amostras para análise**

A coleta foi realizada com o mínimo de exposição do alimento, sendo utilizado materiais esterilizados para obtenção e transporte. Após a aquisição, as amostras foram transportadas imediatamente ao laboratório de farmácia do ICET.

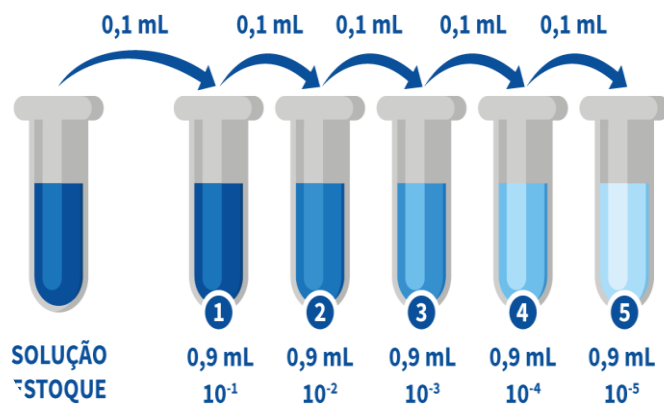
### **3.3.3 Processamento Mínimo**

Antes de começar as análises microbiológicas, todas as superfícies do laboratório foram limpas e, posteriormente, higienizadas com álcool 70 %. Os utensílios que foram utilizados para o processamento das hortaliças, como facas, tábuas, peneiras, potes e ralador foram deixados de molho em solução de hipoclorito de sódio 200 ppm por 10 minutos e lavados. Todas as vidrarias foram lavadas e autoclavadas, assim como todos os meios de cultura.

### **3.3.4 Análises microbiológicas**

Com o intuito de investigar a presença de microrganismo de interesse, foi realizada a técnica de diluição seriada como mostra a figura 06.

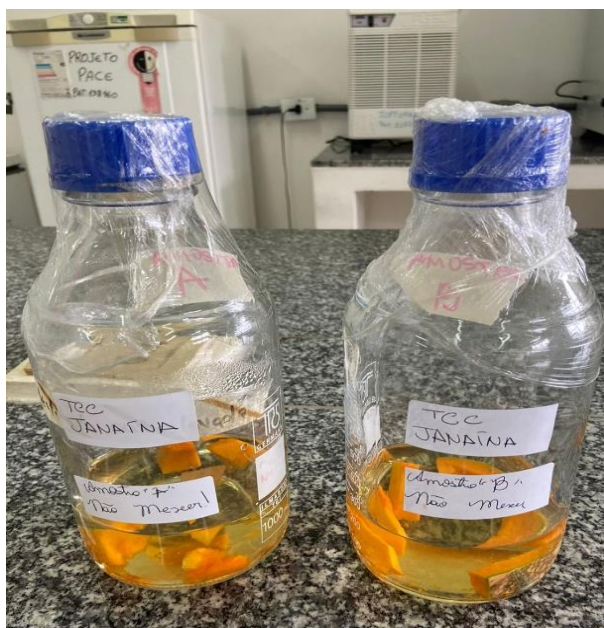
**Figura 06.** Diluição seriada



Fonte: Kasvi, 2023.

Utilizou-se 25g de cada amostra, para 225mL de solução salina peptonada 1%, sendo homogeneizada, e essa foi a diluição  $10^{-1}$ . Foram feitas em triplicatas as análises. Em tubos como mostra a figura 07 contendo 9mL de solução peptonada 0,1%, adicionou-se uma alíquota de 1mL da diluição  $10^{-1}$  em um tubo com 9mL de solução peptonada 0,1% para a criação de diluição  $10^{-2}$  e a próxima diluição foi da mesma forma, a partir da diluição anterior até a  $10^{-3}$  (ARAUJO *et al.*, 2020).

Figura 07. Amostras "A" e "B"



Fonte: Autoria própria, 2023.

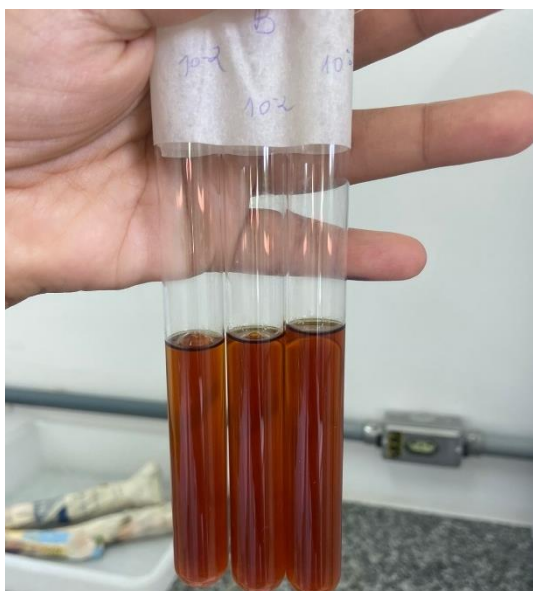
### 3.3.4.1 Identificação de coliformes totais e termotolerantes

Para indicar a presença de coliformes totais e termotolerantes nas amostras, foi usada a técnica de tubos múltiplos, o qual é um método tradicional mais utilizado para a enumeração de coliformes, que é a técnica de fermentação por tubos múltiplos, é uma técnica trabalhosa e demorada, necessita de uma grande quantidade de vidrarias e culturas, necessitando também de um longo período de incubação, podendo passar até 96 horas para que possa fazer a enumeração. A técnica de tubos múltiplos também é utilizada na estimativa da densidade de bactérias do grupo coliforme por número mais provável (NMP) (CETESB, 2018).

#### 3.3.4.1.1 Teste Presuntivo

A princípio foi utilizado o caldo Lauril Sulfato Broch (LSB) como meio de cultura presuntivo.

**Figura 08.** Caldo Lauril Sulfato Broch (LSB)



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

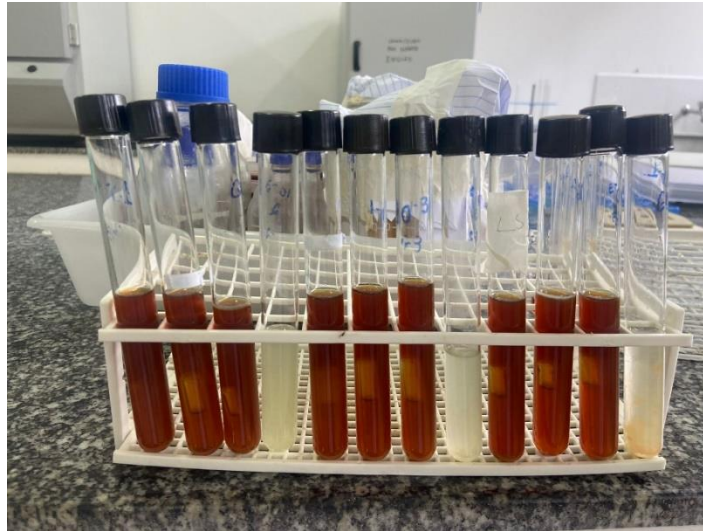
Para este fim, foi transferido 1 ml, com auxílio de uma pipeta graduada estéril, de cada diluição das amostras “A” e “B”, e em seguida acondicionada em tubos em ensaio contendo o caldo LSB com tubo invertido, e estes, foram



mantidos em estufa de cultura por 24 - 48h à 36°C ± 1.

Após 24h e 48h foi analisada a presença de turbidez no meio de cultura e a presença de gás no tubo invertido.

**Figura 09.** Caldo Lauril Sulfato Broch (LSB)



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

#### 3.3.4.1.2 Teste confirmativo para coliformes totais

Após análise das amostras "A" e "B", a fim de identificar a presença de coliformes totais, alíquotas de 1 ml do caldo LSB que indicaram a presença de coliformes foram transferidas para tubos de ensaio contendo o caldo Verde Brilhante (VB) e tubo invertido, conforme Figura 10.

**Figura 10.** Caldo Verde Brilhante (VB)



Fonte: Autoria própria, 2023.

Estes tubos foram mantidos em estufa de cultura por 24 – 48h à  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$  (ARAUJO *et al.*, 2020) (Figura 11).

**Figura 11.** Caldo Verde Brillante (VB) após 48h na estufa

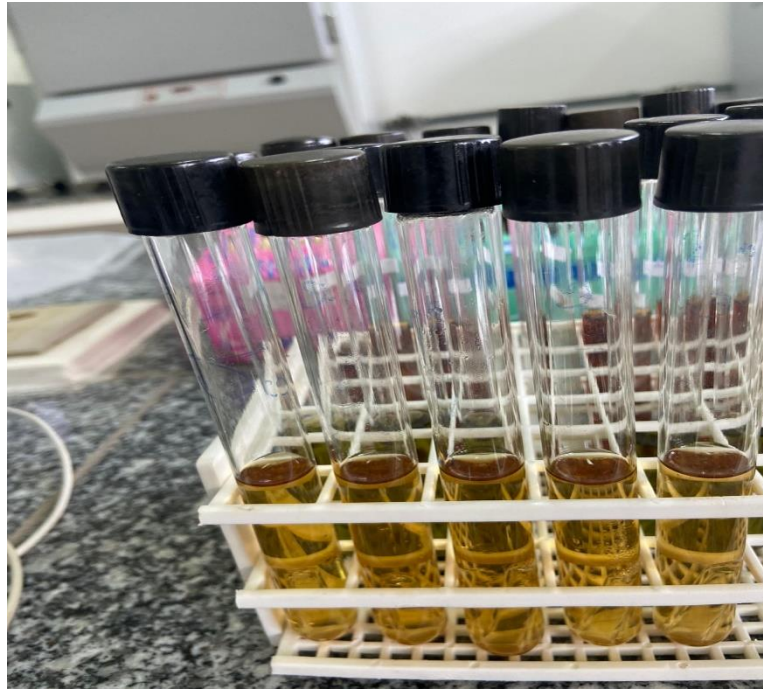


Fonte: Autoria própria, 2023.

#### 3.3.4.1.3 Teste confirmativo para coliformes termotolerantes

As mesmas amostras com indicativo de coliformes, no caldo LSB, foram semeadas em caldo EC-Broth (EC) para identificação e quantificação de coliformes termotolerantes (Figura 12).

**Figura 12.** Caldo EC-Broth (EC)



**Fonte:** A autoria própria, 2023.

Para isso, foram realizados os mesmos procedimentos, onde, foi retirado 1 ml do caldo LSB das amostras “A” E “B”, e transferidos para tubos com caldo EC e tubo invertido, em seu interior. Essas amostras foram mantidas em estufa de cultura por 24 – 48h à  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 1$  (Figura 13).

A identificação da presença de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras, foi através da observação da turbidez do meio de cultura, que é um indicativo de crescimento microbiológico. A presença de gás no interior no tubo invertido, é resultante da fermentação da lactose contida no meio de cultura (ARAUJO *et al.*, 2020).

**Figura 13.** Caldo EC-Broth (EC) após 48h na estufa



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

#### 3.3.4.2 Identificação de *Escherichia coli*

Para confirmação da presença de *E.coli* nas amostras de alimentos, com auxílio de uma alça de platina calibrada, foi retirada uma alíquota de cada amostra com a presença de coliformes termotolerantes, evidenciado pela análise do caldo EC e semeado por esgotamento em uma placa de Petri contendo Macconkey.

Após 48h à  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$  em estufa de cultura, foi possível observar o resultado (ARAUJO *et al.*, 2020) (Figura 14).

**Figura 14.** Placa de Petri contendo Macconkey, após 48h na estufa.



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

O ágar Macconkey é um meio seletivo, pois apresenta combinação de sais biliares e o cristal violeta, que inibem os microrganismos gram positivos, assim reduzindo relativamente doenças causadas por bactérias ou protozoários presentes nas fezes. O ágar contém na sua fórmula lactose e corante vermelho, o que permite que seja visto a olho nu o crescimento das bactérias (Vicente, 2019).

### 3.3.5 Coloração de Gram

Para a visualização da *Escherichia coli*, foi realizado a coloração de gram. A princípio realizado o esfregaço nas lâminas com o material biológico coletados das placas de Petri contendo ágar Macconkey (Figura 15).

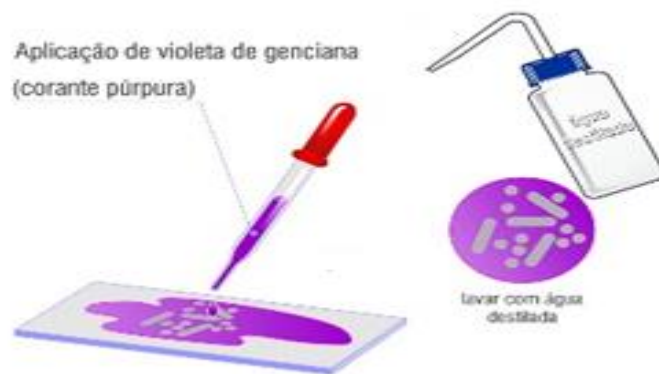
**Figura 15.** Esfregaço do material biológico na lâmina



**Fonte:** Vlab,2023.

Com o esfregaço totalmente seco, cobriu-se o esfregaço com violeta de genciana e logo após deixou-se por aproximadamente 1 minuto (Figura 16).

**Figura 16.** Preparação da lâmina com a fixação do esfregaço.

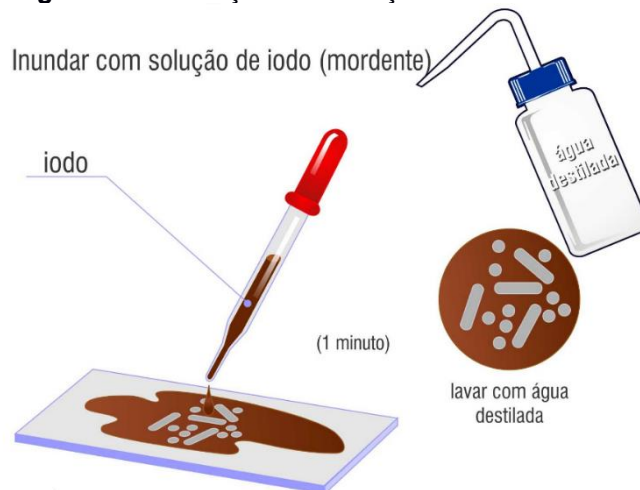


Fonte: Vlab, 2023.

Adicionou-se igual quantidade de água sobre a lâmina coberta com violeta de genciana e então deixou-se agir por mais 1 minuto. Esperou-se escorrer completamente o corante, e lavou-se um filete de água corrente.

Após as células absorverem a solução e ficarem coradas de púrpura, aplicou-se a solução de iodo (mordente) por 1 minuto como mostra a Figura 17.

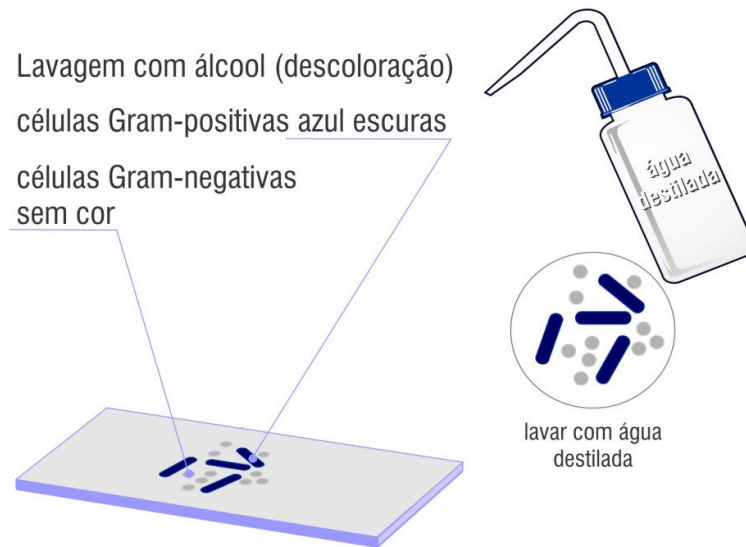
**Figura 17.** Inundação com solução de iodo



Fonte: Vlab,2023.

Adicionou-se água destilada sobre a lâmina, pois as s células ficaram azuis escuras depois de aplicada a solução na lâmina preparada. Lavou se com agente descorante (álcool absoluto) por aproximadamente 15 segundos na lâmina preparada de acordo com a Figura 18.

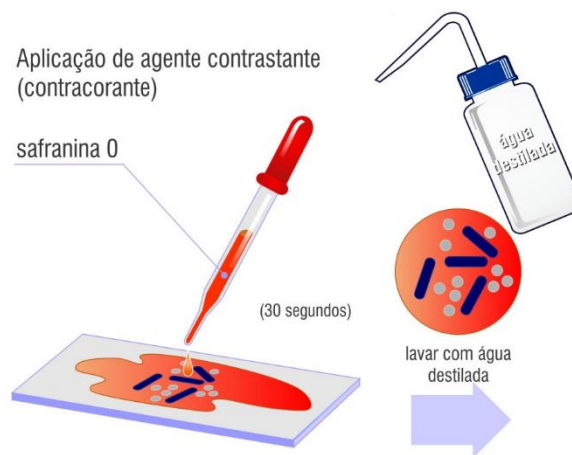
**Figura 18.** Células Gram-positivas azuis e Gram-negativas sem cor



**Fonte:** Vlab, 2023.

Foi feita a aplicação de agente contrastante safranina por 30 segundos nas lâminas, preparadas (Figura 19).

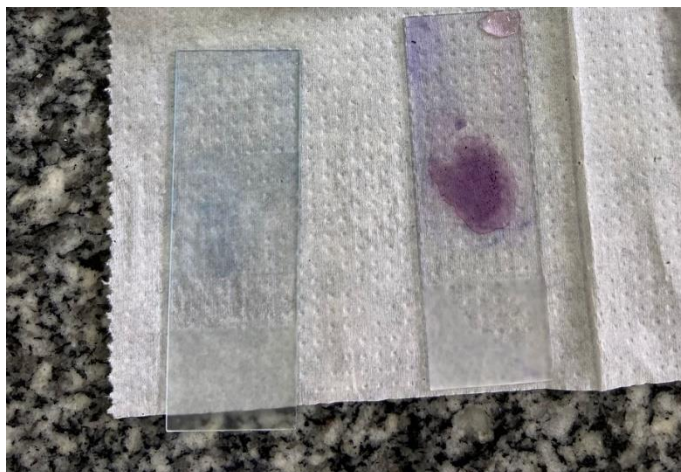
**Figura 19.** Aplicação de safranina.



**Fonte:** Vlab, 2023.

Após o tempo de 30 segundos da aplicação da safranina, lavou-se a amostras com água destilada. Com auxílio de um papel de filtro limpo, secou-se suavemente as lâminas (Figura 20).

**Figura 20.** Lâmina corada



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

Após todo processo de coloração, visualizou-se no microscópio as lâminas, o que permitiu a caracterização e classificação inicial das bactérias (Figura 21).

**Figura 21.** Visualização das espécies



**Fonte:** Autoria própria, 2023.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante dos métodos e propostas acima citados, houve a análise visual das amostras, onde notou-se que a amostra “A” estava com alterações nas características sensoriais, na amostra “B”, notou-se que o alimento estava com suas características sensoriais preservadas, notava-se que era um alimento fresco.

Constatou-se após análise microbiológica, confirmação para coliformes totais e termotolerantes, e *Escherichia coli*, através da presença de gás nos tubos de Durham nas fases presuntiva, confirmativa e complementar.

### 4.1 OBSERVAÇÃO DAS EMBALAGENS DAS AMOSTRAS

Foi observado que a amostra “A” e “B”, não atendiam as exigências da RDC nº 727 de 1º de julho de 2022, Art. 7º, a qual dispõe sobre a obrigatoriedade das informações nos rótulos, tendo em vista que as amostras não atendem os requisitos que são propostas a seguir:

- Denominação de venda;
- Advertências relacionadas ao uso de aditivos alimentares;
- Rotulagem nutricional;
- Conteúdo líquido;
- Identificação da origem;
- Identificação do lote;
- Instruções de conservação, preparo e uso do alimento, quando necessário;

Mediante isso sugere-se, que se use de tecnologia como atmosfera modificada e/ou atmosfera controlada, e que seja feita uma fiscalização mais rigorosa pelos órgãos competentes para garantir o cumprimento das resoluções.

Pensando nessa perspectiva, quando observada das embalagens das amostras, constatou-se que em ambas as amostras não se usa a tecnologia de atmosfera controlada nem atmosfera modificada, e que ainda é utilizado as

embalagens de forma de plástico envoltas com plástico filme.

De acordo com Medalha (2014), quando utilizado atmosfera modificada no armazenamento de alimentos, o período de vida útil e a qualidade do produto aumentam, diminui-se as reações químicas e bioquímicas deteriorantes, sendo possível em alguns casos o impedindo o crescimento de organismos.

#### 4.2 COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES TERMOTOLERANTES

O resultado da **fase presuntiva**, foi feita através da identificação de crescimento de coliformes totais no caldo LSB, resultado identificado pela ocorrência de reação ácida e produção de gás em todo os tubos (retida no tudo de Durhan), como pode-se notar nas Figuras 22 e 23. Em ambas as amostras houve formação de gás, após 48h.

**Figura 22.** Amostra “A”



**Fonte:** Autoria própria,2023.

**Figura 23.** Amostra “B”



Fonte: Autoria própria,2023.

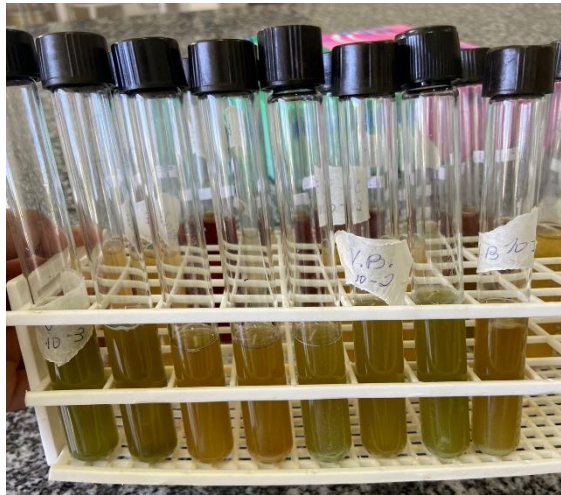
Na **fase confirmativa**, efetuou-se o repique para os tubos contendo caldo verde brilhante. O resultado positivo é através da identificação dos que tiverem crescimento de coliformes totais, identificado pela ocorrência de produção de gás em todo os tubos de Durhan (Fontes,2023) (Figura 24 e 25).

Figura 24. Amostra “A”



Fonte: Autoria própria, 2023.

Figura 25. Amostra “B”



**Fonte:** Autoria própria,2023.

Observou-se a presença de coliformes totais a partir da formação de gás em todo os tubos e grau de turbidez nos tubos de Durhan, os resultados analisados constam na tabela 1.

A legislação brasileira não define valores máximos para contagens toleradas de coliformes totais, na instrução normativa – IN nº 161, de 1º de julho de 2022 – ANVISA ,que estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos, somente para categoria 24, (águas envasadas),o qual orienta caso o resultado para coliformes totais seja “Presença em 250mL”, deve ser realizada a pesquisa de *Escherichia coli* em 250ml (Brasil,2023).

Tanto nas fezes quanto no ambiente, é possível encontrar um grupo de bactérias de coliformes totais, cuja presença é considerada um forte indicador de manipulação e condições higiênico-sanitárias inadequadas (SOUZA et al, 2018).

Segundo Macedo et al., (2016), a classificação dos coliformes é feita em dois grupos, sendo o primeiro os coliformes totais, advindos do ambiente, indicando a qualidade da higiene dos alimentos, e o segundo grupo os coliformes termotolerantes, que surgem de contaminação fecal recente, o qual estão relacionados com a qualidade sanitária.

Na **fase complementar** houve a identificação dos coliformes termotolerantes, na qual fez-se o repique dos tubos presuntivos para outros tubos, desta vez contendo meio EC, o qual atesta positivo para coliformes

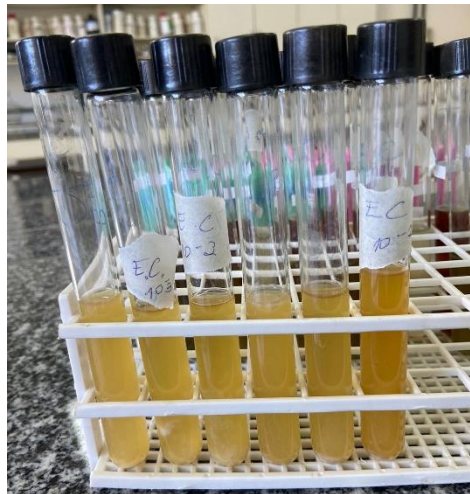
termotolerantes os tubos identificados pela ocorrência de produção de gás em todo os tubos de Durham (Fontes,2023) (Figura 26 e 27).

**Figura 26.** Amostra “A”



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

**Figura 27.** Amostra “B”



**Fonte:** Autoria própria,2023.

#### 4.3 ESCHERICHIA COLI

De acordo com a RDC nº 724, de 1º de julho de 2022, e a instrução normativa - IN nº 161, de 1º de julho de 2022, a quais limitam os valores de Escherichia coli que podem conter nos alimentos para que o resultado seja satisfatório ou insatisfatório.

A IN nº 161, de 1º de julho de 2022, define padrões microbiológicas, para categoria 2.B, hortaliças, raízes, tubérculos, fungos comestíveis e derivado, e para alimentos preparados prontos para o consumo, categoria 21, c. Ambas as categorias adotam os mesmos valores para *Escherichia coli*/g (Tabela 1).

**Tabela 1.** Padrões microbiológicos para alimentos, com exceção dos alimentos comercialmente estéreis

<b>Categorias Específicas</b>	<b>Microrganismo/Toxina/Metabólito</b>	<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
<b>Categoria 2.B</b> Preparados (inteiros, descascados ou fracionados), sanificados, branqueados, refrigerados ou congelados, que não necessitam de tratamento térmico efetivo, previamente ao consumo.	<i>Escherichia coli</i> /g	5	2	10	10 <sup>2</sup>
	<i>Salmonella</i> /25g	10	0	Aus	-
<b>Categoria 21.C</b> Alimentos preparados prontos para o consumo contendo exclusivamente produtos de origem vegetal, elaborados sem emprego de calor	<i>Escherichia coli</i> /g	5	2	10	10 <sup>2</sup>
	<i>Salmonella</i> /25g	5	0	Aus	-

**Fonte:** Brasil, 2023.

Neste estudo não foi realizado o teste para *Salmonella* spp. nas amostras, em virtude das limitações do laboratório. A contagem de coliformes identificados nas amostras foram >1100 NMP/g, conforme a tabela 1, de Número Mais Provável para quantidade de amostra inoculada: 1,0 - 0,1 e 0,01g ou mL.

Os valores encontrados, quando comparados com os valores de referência da Resolução ANVISA RDC nº 724, de julho de 2022, que define o valor <10<sup>2</sup> NMP/g para coliformes termotolerantes, aponta que 100% das amostras analisadas não estão em conformidade com a legislação vigente. No

presente trabalho, todas as amostras estavam com contaminação acima do preconizado pela lei.

**Tabela 2.** Resultado para coliformes utilizando a tabela do NMP/g

	Número de Tubos Positivos			NMP/g
	1	0,1	0,01	
Amostra "A"	3	3	3	>1100
Amostra "B"	3	3	3	>1100

**Fonte:** Bacteriological Analytical Manual Online, 2001.

Bruno et al., (2015) realizaram análises microbiológica em alimentos minimamente processados e comercializadas em Fortaleza /CE, e obtendo o resultado que que 13,3% das amostras de hortaliças/tubérculos estavam com contagem de coliformes fecais acima do padrão, dessa forma em desacordo com a legislação vigente.

De acordo com Macedo et al., (2016), a presença de coliformes termotolerantes em alimentos é indicativo de contato direto e/ou indireto com fezes. A contaminação do alimento por esse microrganismo é indicativa que houve erro durante o processo de produção, ou que envolve a falta boas práticas das das empresas do ramo alimentício.

No ágar MacConkey foi encontrada a espécie da família Enterobacteriaceae: *Escherichia coli* nas amostras "A" e "B, o resultado positivo se dar em virtude de as bactérias Gram negativas produzirem colônias com coloração rosa, pois são formadoras por bactérias fermentadoras de lactose, como pode-se ver nas Figuras 28 e 29.

**Figura 28.** Amostra "A"



**Fonte:** Autoria própria,2023.

**Figura 29.** Amostra “B”



**Fonte:** Autoria própria,2023.

Segundo Nunes et al., (2016), a família Enterobacteriaceae é uma das mais importantes famílias bacterianas, pois nelas são possíveis encontrar os patógenos mais isolados para o homem e para o animal. Em relação ao homem, esses patógenos são considerados como alguns dos principais agentes de infecção hospitalar e, sem dúvida, são a principal causa de infecção intestinal em muitos países.

Alves e Ueno (2010), analisaram 70 amostras, afim de avaliar a segurança de alimentos servidos em self-service, e observaram que os resultados para coliformes a 45°C apresentaram-se dentro dos valores estipulados pela legislação. Já *Escherichia coli* variou de <0,5 a 3,7 log NMP/g e estava presente em 21 amostras, sendo 8 delas com valores superiores ao permitido pela legislação.



No estudo de Silva et al., (2007) foram avaliadas 56 amostras de vegetais minimamente processados comercializados na cidade de Porto Alegre (RS), o qual obtiveram resultado positivo em um total de oito amostras para presença de *Escherichia coli*.

Lucena (2022), analisou a vida de prateleira de saladas minimamente processadas com diferentes tratamentos: lavagem, sanitização e embalagem a vácuo, e após a realização das análises microbiológicas, o resultado para *E.coli* apresentou a combinação de tubos positivos 0-0-0 (< 3,0 NMP/g) e ausência em 25g de *Salmonella*, resultados esses de acordo com a legislação vigente.

No estudo de Santos et al., (2017) sobre a qualidade e segurança microbiológica de hortaliças convencionais, orgânicas e minimamente processadas, analisou 105 amostras adquiridas no município de Piracicaba/SP e submetidas à enumeração de bactérias mesófilas, Enterobacteriaceae, coliformes totais, *Escherichia coli*, e *Salmonella* spp. A *E. coli* foi detectada em 49 amostras, com contagens médias de  $1,4 \pm 0,9$ ,  $1,2 \pm 0,6$  e  $0,9 \pm 0,8$  log NMP/g, respectivamente. Dentre estas, 12 apresentaram contagens acima do limite estabelecido pela legislação vigente.

Menezes e Moreira (2012), realizaram um estudo similar fazendo Análise Microbiológica de Abóbora Minimamente Processada e Comercializada em Feira Livre no Município de Itapetinga-BA. O estudo revelou que 83,33% das amostras apresentaram altos valores para contagem total, todas as amostras estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, uma vez que apresentaram altos índices de contaminação por coliformes totais e termotolerantes e resultado positivo para salmonela.

Todos os trabalhos mencionados buscam corroborar com os resultados encontrados neste estudo, pois a presença de coliformes a 45 °C acima do limite necessário recomenda as péssimas condições em que esse processamento foi efetivado.

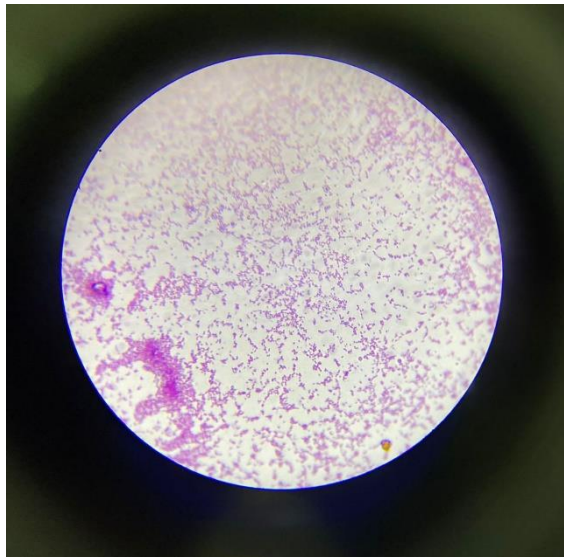
#### 4.4 COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram é um respeitável teste realizado nos laboratórios de microbiologia, sendo uma solução secundária no diagnóstico de doenças bacterianas, a partir de um determinado perfil tintorial as bactérias coram-se de roxo ou de rosa e logo são classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas, respectivamente (Picoli e Freitas,2007).

#### 4.4.1 Amostras “A”

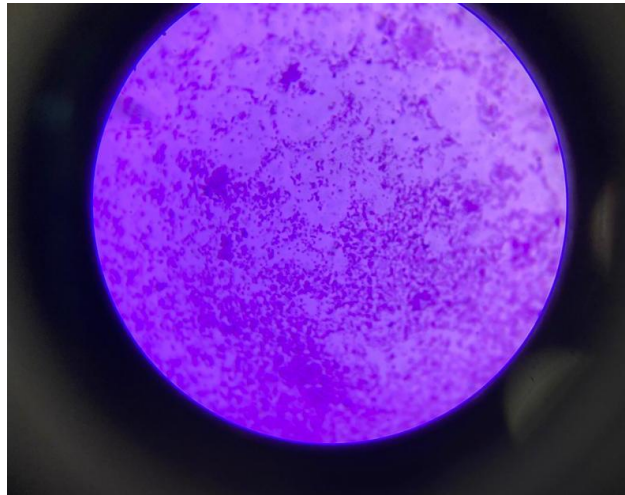
Nas lâminas que foram realizadas o esfregaço com o material biológico coletados das placas de Petri contendo ágar Macconkey, verificou-se que os bacilos coraram-se de rosa, com estrutura similar ao Gram negativo, como podemos ver nas Figuras 30, 31 e 32.

**Figura 30.** Amostra “A”, PLACA DE PETRI 1.



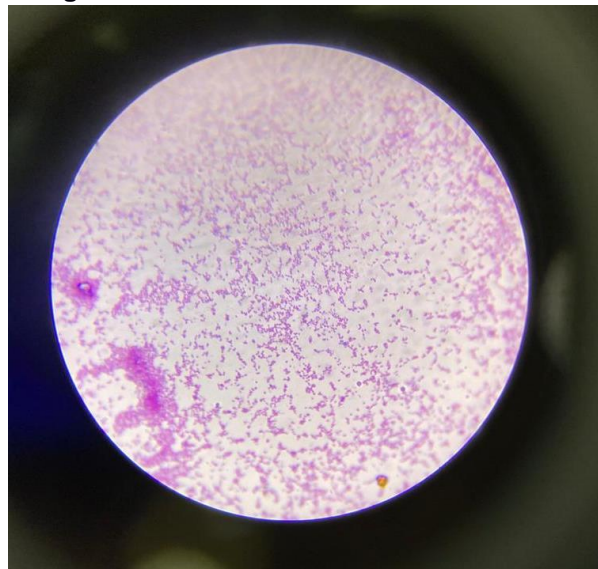
Fonte: Autoria própria,2023.

**Figura 31.** Amostra “A”, PLACA DE PETRI 2.



Fonte: Autoria própria,2023.

**Figura 32.** Amostra “A”, PLACA DE PETRI 3.



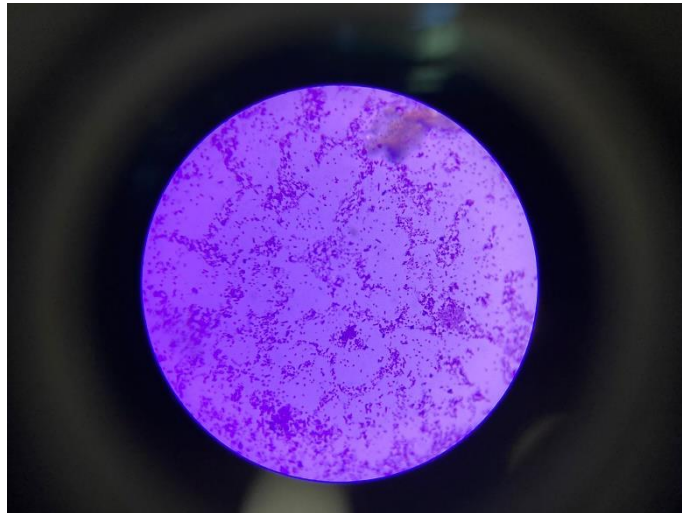
Fonte: Autoria própria,2023.

Na amostra “A”, temos uma confirmação mais exata para Escherichia Coli, pois notasse a amostra mais homogênea, com coloração rosa, e podemos ver a estrutura do gram.

#### 4.4.2 AMOSTRAS “B”

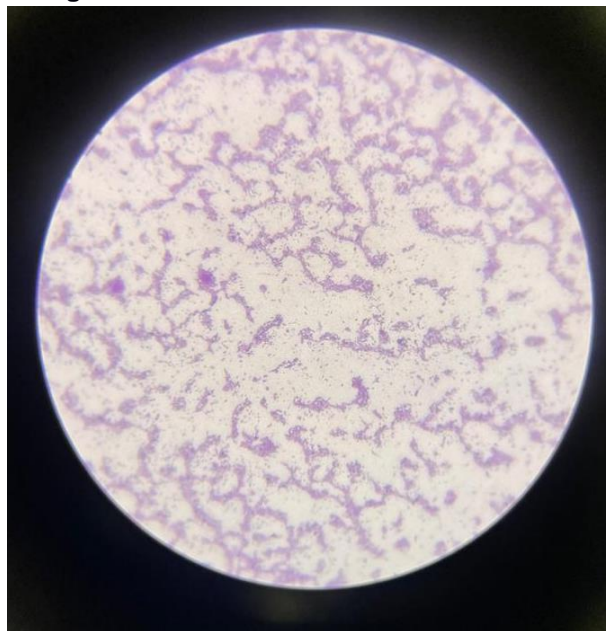
Na amostra “B”, ao bacilos estão mais dispersos, e foi identificado outras estruturas além do gram negativo, o que podemos concluir, que pode-se ter a presença de outros microrganismos, desta feita, não sendo possível confirmar a estrutura da Escherichia coli no teste da coloração de gram para essa amostra (Figuras 33, 34 e 35).

**Figura 33.** Amostra “B” Amostra “A”, PLACA DE PETRI 4.



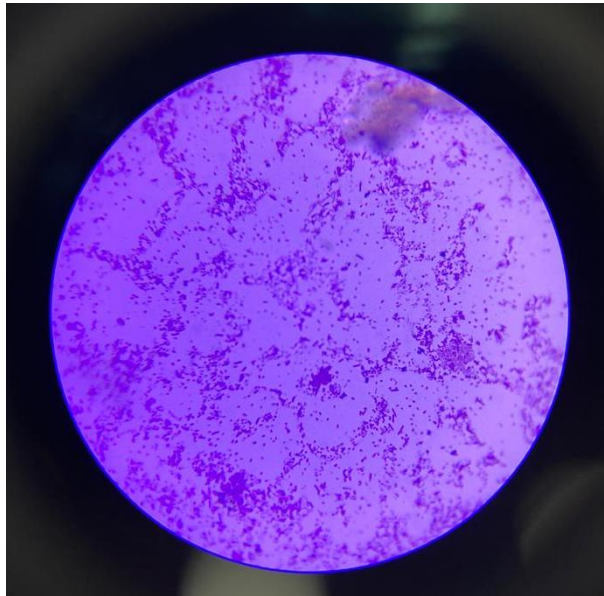
**Fonte:** Aatoria própria,2023.

**Figura 34.** Amostra "B", PLACA DE PETRI 5.



**Fonte:** Aatoria própria,2023.

**Figura 35.** Amostra "B", PLACA DE PETRI 6.



**Fonte:** Autoria própria,2023.

O estudo realizado por KONEMAN,(2001) explica as diferenças entre as culturas negativas e presença de bactérias ao Gram, podendo ter fatores de presença de microrganismos exigentes, como bactérias anaeróbias, as quais não foram pesquisadas, ou devido ao uso de antimicrobianos, que apresentam atividade bacteriostática “in vitro”.

Assim, pode-se concluir que a coloração de Gram, mesmo apresentando uma sensibilidade relativamente baixa, pode ser considerada uma ferramenta útil na análise dos líquidos biológicos, contribuindo no diagnóstico prévio destas infecções.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos métodos e propostas acima citados, constatou-se que após a execução do presente trabalho, obteve-se resultados para presença de contaminantes microbiológicos nos vegetais minimamente processados através das metodologias convencionais adotadas.

Portanto, foi possível observar a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes em ambas as amostras dos alimentos, ocasionados a partir de um forte indicador de manipulação e condições higiênico-sanitárias inadequadas dos alimentos. Na análise sobre *Escherichia coli* foi encontrado a espécie da família *Enterobacteriaceae* ocasionado em virtude de as bactérias Gram negativas produzirem colônias com coloração rosa.

Diante do exposto, observou-se a presença da contaminação por microrganismos em ambas as amostras analisadas através de métodos convencionais, a contaminação se dá normalmente através do manuseio inadequado dos alimentos, assim, como a falta de boas práticas das empresas do ramo alimentício.

Vale ressaltar a realização de estudos acadêmicos futuros para beneficiar o bem estar dos consumidores dos alimentos e das empresas do ramo alimentício, assim como reforçar a fiscalização por meio dos órgãos responsáveis quanto a produção e manuseio dos alimentos minimamente processados.

## REFERÊNCIAS

SANTOS.I. ET AL. **QUALIDADE E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE HORTALIÇAS CONVENCIONAIS, ORGÂNICAS E MINIMAMENTE PROCESSADAS. V. 1 N. 1 (2022):** ANAIS DO 1º CONGRESSO DE SEGURANÇA E QUALIDADE DOS ALIMENTOS.SESSÃO 11 - OUTROS TÓPICOS EM MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 2017.

KONEMAN, E W, et al. **Diagnóstico microbiológico.** Rio de Janeiro: Medsi 2011, P, 494, 919-920.

ZANGIROLAMI. R. J. ECHEIMBERG, J.V; LEONE, C. **Tópicos de metodologia da pesquisa:** Estudo de corte transversal. J Hum. Growth DEV, São Paulo, v. 28, n 3, p.35-360,2018.

LUCENA, L.L. **Estudo da vida de prateleira de saladas minimamente processadas com diferentes tratamentos:** lavagem, sanitização e embalagem a vácuo. Universidade Tecnológica do Paraná, 2018.

MENDANHA, R.S.R.R. **Atmosfera modificada na embalagem de fruta, vegetais, inteiros e minimamente.** Instituto Superior de Agronomia- Universidade de Lisboa.

PINHEIRO, N.M.S. et, al. **Avaliação da qualidade microbiológica d frutos minimamente processados comercializados em supermercados de fortaleza.** Revista Brasileira de Fruticultura, JABOTICABAL – são Paulo, v. 27. N. , p. 153-156, 2005.

SILVA, W.L; MEDEIROS R.P. **Eficiência do cloro para sanitização de hortaliças. 5º simpósio de segurança alimentar.** Alimentação e saúde, 2015.

SOUZA L; FILIZOLA L. Avaliação de determinação de coliformes em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Recife-PE. Faculdade de Pernambuco de saúde , Pernambuco, 2018.

MACEDO, V.F; ZANARDO, J.G; LOPES, P.P.C; MENDONÇA. H.F.M. Prevalência de coliformes e staphylococcus aureus em mãos de manipuladores de alimentos de feira livre de vitória, ES. SALUS, J HEALTH sci. 2(2) 27-38.

BRASIL, **Instrução normativa** –IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022.

BRASI, **Resolução da diretoria colegiada- RDC** Nº 724 de 1º de Julho de 2022.

Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 5º edição  
NEUSELY DA ILVA.

ABERC- Associação Brasileira de empresas de refeição coletivas. Mercado real.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Ministério da saúde**.  
Resolução RDC Nº 12, de 02 de Janeiro de 2001, Seção 1, nº7-e p.45-53 Brasília,  
2001.

ARAUJO et, al. **Análise microbiológica de alimentos minimamente processados comercializados em Campos dos Goytacazes**. Revista Brasileira Interdisciplinar de pensamento científico. Rio de Janeiro, 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Bactérias coliformes totais, coliformes fecais e escherichia coli em alimentos: determinação do número mais provável (NMP)**. ABNT, Rio de Janeiro, 1991.

BALCHINAS,D. Gestão de UAN: **Um resgate do binômio: alimentação e nutrição**. ROCA, São Paulo, 2014.

BANWART, G.J. **BasacFood Microbiology**. 2.ed, New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.

BELELA, A.S.C; PEREIRA M.L.G. **Hand Hygiene as a caring practice: a reflection on professional responsibility**. Ver Bras Ebferm, 2017.

BERBARI. S.A.G; PASCHOALINO, J.E; SILVEIRA, N.F.A. **Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada**. Ciência e tecnologia de alimentos, v. 21, n 2, p. 197-201, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**, 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde- Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Integrado de Vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, 2010.



BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção em Saúde- Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2.ed. reimp. Brasília, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria 451, de 19 de Setembro de 1997. Dispõe sobre regulamento técnico sobre princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 1997.

CARVALHO, L.S.C, et, al. **Boas práticas e qualidade sanitária dos alimentos servidos em restaurantes do tipo self-service no campus da universidade Federal do Pará**. Belém, 2016.

CENCI, S.A. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças: Tecnologia, Qualidade e sistema de embalagem**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de alimentos, 2011.

CETESB. L5.202: **Coliformes totais, coliformes termotolerantes e eschericia cole** – determinação pela técnica de tubos múltiplos. São Paulo, 2018.

CHAKRABORTY, Snehasis; RAO, Pavuluri Srinivasa; MISHRA, Hari Niwas. **Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (Ananas comosus L.) puree during highpressure and thermal treatments**. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 27, p. 57–68, 2015

CHAVES, A. F. A. R. **Estudo das variáveis utilizadas na decisão de compras no comércio varejista de alimentos de auto-serviço – supermercados**. 2002. 206f. Dissertação (Mestrado em Controladoria e Contabilidade). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

CUNHA, L. F.; AMICHI, K. R. **Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses e práticas de higiene de manipuladores de alimentos: revisão da literatura**. *Revista Saúde e Pesquisa*, Vitória, v. 7, n. 1, p.147-157, abr. 2014.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Publicado em: 26/12/2019 | Edição: 249 | Seção: 1 | Página: 96. Órgão: **Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância**

**Sanitária/Diretoria Colegiada. RESOLUÇÃO - RDC Nº 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019**

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M. C. D. **Microbiota contaminante em repolho minimamente processado**. Rev. Ciên. Tec. de Alim, v. 24, n. 2, p. 207-211, 2004.

FORSYTHE, S. **Microbiologia da segurança alimentar**. Ed. Artmed,2002.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M.; Destro, M. T. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.p27-171.

GERMANO, P; GERMAO, M. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. 6ª edição. São Paulo.Ed.Manole LTDA,2019.

GIANNONI, J. et al. **Caracterização física, química, bioquímica e microbiológica da pitaya vermelha (Hylocereus costaricensis) minimamente processada armazenada sob refrigeração**. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, Curitiba, v.5, n.1, p.438-449, jan./mar. 2022.

GOULART, A.E.R.; LACERDA, I.C.A.; DIAS, R.S. **Potencial risco de intoxicação alimentar por Staphylococcus spp. enterotoxigênicos isolados de bolos com cobertura e recheio**.Periódico Científico do Núcleo de Biociências, Belo Horizonte, v. 6, n. 11, p.11-17, 30 ago. 2016.

IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Censo Brasileiro de 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2013.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza:Acribia,1984. 431p.

MARCHI, D. M. et al. **Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007**. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, v. 20, n. 3, p. 401-407, set. 2011.

MARTINS, I. et al. **Análise microbiológica de hortaliças e vegetais minimamente processados comercializados em grandes redes de supermercados de Belo Horizonte-MG**. Brazilian Journal of of Health Review, Curitiba, v.4, n.1, p 1172-1185 jan./feb. 2021

MONTEIRO, C.A. et al. NOVA. **The star shines bright**. Food classification. Public health World Nutrition January-March 2016, 7, 1-3, 28-38.

NASCIMENTO, K. D. O., AUGUSTA, I. M., da ROCHA RODRIGUES, N., PIRES, T., BATISTA, E., JÚNIOR, J. L. B., BARBOSA, M. I. M. J. **Alimentos Minimamente Processados: Uma tendência de mercado**. Acta Technol. v. 9, n.1, p. 48-61, 2014.

PILON, L. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Segurança das Hortaliças Minimamente Processadas**. 2017.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton: CRC,, 1996. 516p.

SAAB, W. G. L.; GIMENEZ, L. P.; RIBEIRO, R. M. **Supermercados no Brasil – O movimento das empresas menores. Área de Operações Industriais**. Gerência Setorial de Comércio e Serviços, nº. 24, 2000.

SANCHES, G.A. et al. **Análise sensorial e viabilidade econômica da mandioca de mesa in natura e congelada**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. Ponta Grossa, v. 11, n. 2, p. 2332-2349, jul./dez. 2017.

SANTOS, J. S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Revisão: **Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada**. Braz. J. Food Technol., Campinas, v.15, n.1, p.1-14, Mar. 2012.

SCHUMANN, A.C. et al. **Avaliação microbiológica de mãos dos manipuladores de alimentos e de utensílios de cozinha do serviço de nutrição de um hospital do norte do estado do Rio Grande do Sul**. Perspectiva, Erechim, v. 41, n. 153, p.7-17, mar. 2017.

SILVA, M. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sismeta simplate**. Tese

(Mestrado em Ciência) – Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz”,  
Universidade de São Paulo, p.87.2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológico de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 259p.

SILVA,B; SONEHARA,I. **Metodologias de determinação de sensibilidade antimicrobiana aplicadas a extrato vegetal bruto (hidroalcoólico): comparação entre duas técnicas de difusão em ágar**. XIV Jornada de Iniciação Científica e VIII Mostra de Iniciação Tecnológica. Universidade Presbiteriana Mackenzie.São Paulo,2018.