

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE  
ALIMENTOS COM A UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS  
CONVENCIONAIS E DO SISTEMA SIMPLATE**

**MARIA CECÍLIA DA SILVA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Ciências, Área de Concentração: Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo – Brasil  
Maio - 2002

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE  
ALIMENTOS COM A UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS  
CONVENCIONAIS E DO SISTEMA SIMPLATE**

**MARIA CECÍLIA DA SILVA**  
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **CLÁUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Ciências, Área de Concentração: Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo – Brasil  
Maio - 2002

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Silva, Maria Cecília da

Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate / Maria Cecília da Silva. -- Piracicaba, 2002.

75 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

Bibliografia.

1. Microbiologia de alimentos 2. Microrganismo 3. Qualidade dos alimentos I.

Título

CDD 576.163

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

*DEDICO,*

*Aos meus pais,*

*João e Rita, pela prática do amor.*

*Às minhas irmãs,*

*Cristina, Isabel, Helena e Ana Cláudia, pelo suporte e orações.*

*Ao meu irmão,*

*Felipe, por existir e ser tão especial.*

*Ao meu cunhado,*

*Marcelo, pela disposição em ajudar.*

*Ao meu sobrinho,*

*João Guilherme, tão amado e tão único.*

*Que Deus os abençoe sempre.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, princípio, meio e fim.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Ao Depto. de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, nas pessoas de seus professores e funcionários.

Ao Professor Dr. Cláudio Rosa Gallo, pelo acompanhamento, paciência, orientação e ensinamentos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Professora Dra. Sônia M. DiStéfano Piedade, a José Alberto Ambrósio e à Janaína Pereira, pela ajuda na realização da análise estatística.

Ao Professor Dr. Jorge Horii, pela paciência e colaboração na parte final do trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Cecília Helena Nogueira, Denise de Almeida Leme e Rose Ocangne, pelo inestimável auxílio na realização do trabalho, mas principalmente, pela amizade.

Às bibliotecárias, Beatriz H. Giongo e Mídián Gustinelli, pelo auxílio técnico no decorrer do curso.

À secretária do curso de pós-graduação, Regina L. de Mello Lourenço, pelos esclarecimentos e auxílio, referentes ao curso.

Ao técnico em desenho, Luiz Carlos Rodrigues, pelo precioso auxílio na parte gráfica.

Aos amigos feitos antes e durante o curso de pós-graduação, em especial à Célia R. Faganello, Cléo de Carvalho e Patrícia Anchorena.

A todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

*O caminho de Deus é perfeito; a palavra do Senhor é provada: é um escudo para todos os que nele confiam.*

*Porque, quem é Deus senão o Senhor? E quem é rochedo senão nosso Deus?*

*Deus é o que me cinge de força e aperfeiçoa o meu caminho.*

*Salmo 18:30-32.*

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Microrganismos indicadores.....	3
2.2 Análise microbiológica.....	4
2.2.1 Contagem em placas.....	5
2.2.1.1 Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios.....	5
2.2.1.2 Contagem de bolores e leveduras.....	6
2.2.2 Técnica do Número Mais Provável.....	6
2.2.2.1 Coliformes totais, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i> .....	9
2.2.2.2 Coliformes totais.....	9
2.2.2.3 Coliformes fecais.....	10
2.2.2.4 <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.3 O sistema SimPlate.....	11
2.3.1 Tabela de NMP para o sistema SimPlate.....	12
2.3.2 SimPlate contagem total.....	14
2.3.3 SimPlate bolores e leveduras.....	15
2.3.4 SimPlate coliformes totais e <i>E. coli</i> .....	16
2.3.5 Principais vantagens do sistema SimPlate.....	17

2.3.6 Algumas desvantagens do sistema SimPlate.....	17
2.4 Padrões e legislação.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Amostragem.....	21
3.2 Preparo das amostras.....	22
3.3 Análises e meios de cultura.....	22
3.3.1 Metodologia convencional.....	23
3.3.1.1 Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios.....	23
3.3.1.2 Contagem de bolores e leveduras.....	24
3.3.1.3 Número Mais Provável de coliformes totais e coliformes fecais.....	24
3.3.2 Sistema SimPlate.....	27
3.3.2.1 Contagem total.....	27
3.3.2.2 Contagem de bolores e leveduras.....	27
3.3.2.3 Contagem de coliformes totais e <i>E. coli</i> .....	28
3.4 Avaliação dos resultados.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Contagem total de mesófilos aeróbios.....	29
4.1.1 Análise microbiológica e estatística.....	29
4.1.1.1 Alimentos de origem animal.....	34
4.1.1.2 Alimentos de origem vegetal.....	37
4.2 Contagem de bolores e leveduras.....	39
4.2.1 Análise microbiológica e estatística.....	39
4.2.1.1 Alimentos de origem animal.....	43
4.2.1.2 Alimentos de origem vegetal.....	46
4.3 Contagem de coliformes totais.....	48
4.3.1 Análise microbiológica e estatística.....	48
4.3.1.1 Alimentos de origem animal.....	53
4.3.1.2 Alimentos de origem vegetal.....	56
4.4 Contagem de coliformes fecais/ <i>E. coli</i> .....	58
4.4.1 Análise microbiológica.....	58



	viii
4.4.1.1 Alimentos de origem animal.....	60
4.4.1.2 Alimentos de origem vegetal.....	63
5 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS  
COM A UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS CONVENCIONAIS  
E DO SISTEMA SIMPLATE**

Autora: MARIA CECÍLIA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. CLÁUDIO ROSA GALLO

**RESUMO**

Com a finalidade de se avaliar a correlação entre o sistema SimPlate e metodologias convencionais na análise microbiológica de alimentos, dezoito alimentos (nove de origem vegetal e nove de origem animal) foram analisados para contagem total de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras e coliformes totais e fecais. Os resultados das análises microbiológicas foram comparados através do teste F, tendo havido diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os métodos. As médias foram submetidas ao teste t-Student ( $p < 0,05$ ); para a contagem total de mesófilos aeróbios apenas em dois dos quinze alimentos considerados, maçã e beterraba, as metodologias convencional e SimPlate não diferiram entre si; para bolores e leveduras as metodologias não diferiram em quatro dos treze alimentos considerados, lingüiça, peixe, cheiro-verde e beterraba, e para coliformes totais, em seis dos doze alimentos considerados, carne suína, frango, lingüiça, leite cru, pêra e tomate. Uma análise de regressão dos dados mostrou boa correlação entre os dados obtidos para coliformes totais, pela metodologia dos tubos múltiplos e o SimPlate (0,88) e os dados de mesófilos aeróbios, obtidos pelo PCA e o SimPlate (0,80) e baixa

correlação entre os dados obtidos na determinação de bolores e leveduras pelo BDA e o SimPlate (0,69).

**UTILIZATION OF CONVENTIONAL METHODOLOGIES  
AND SIMPLATE SYSTEM FOR MICROBIOLOGICAL  
QUALITY EVALUATION OF FOODS**

Author: MARIA CECÍLIA DA SILVA

Adviser: Prof. CLÁUDIO ROSA GALLO

**SUMMARY**

In order to evaluate correlation among SimPlate system and conventional methods for food microbiological analysis, eighteen foods (nine from vegetable origin and nine from animal origin) were analyzed for mesophilic aerobic, yeasts and molds, total coliforms and fecal coliforms. Results of the three analysis were compared and significant differences ( $p < 0,05$ ) occurred among the majority of foods. For mesophilic aerobic counts, between the methodologies, PCA and SimPlate, difference were not significant in two of fifteen considered foods, apple and beetroot; for yeasts and molds, using acidify PDA and SimPlate, difference were not significant in four of thirteen considered foods, mixed sausage, fish, parsley and Welsh onion and beetroot; for total coliforms, using three-tube method and SimPlate, difference were not significant in six of twelve considered foods, raw pork, chicken, mixed sausage, raw milk, pear and tomato. Regression analysis of data showed correlation coefficients like, 0,88 for three-tube method and SimPlate; 0,80 between PCA and SimPlate and 0,69, between acidify PDA and SimPlate.

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão intimamente associados com a disponibilidade, a abundância e a qualidade do alimento para consumo humano. Alimentos são facilmente contaminados com microrganismos na natureza, durante manipulação e processamento. Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio para o crescimento de microrganismos. Se esses microrganismos tiverem condições de crescer, podem mudar as características físicas e químicas do alimento e podem causar sua deterioração. Os microrganismos no alimento podem também ser responsáveis por intoxicações e infecções transmitidas por alimentos (Pelczar Jr. et al., 1997).

O conhecimento cada vez mais amplo da transmissão de doenças através dos alimentos tem determinado que um número cada vez maior de países considere a necessidade de submeter estes produtos a certas provas ou estudos destinados a avaliar sua inocuidade e sua qualidade. Conseqüentemente, com esta necessidade muitas técnicas têm sido desenvolvidas (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1984).

A necessidade pela rapidez dos resultados de análises microbiológicas se torna cada vez maior, em face do alto volume de alimentos à disposição do consumidor em curto espaço de tempo; segundo Silva (1996), este fato tem ocasionado o surgimento de métodos rápidos para essas análises.

Segundo Hajdenwurcel (1998) os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70 em conseqüência da necessidade de se reduzir o tempo de análise nos laboratórios de microbiologia, aumentando-se a produtividade do trabalho realizado. Tais métodos apresentam uma série de vantagens como redução do tempo de análise, significando menor retenção do produto na indústria, diminuição dos custos, simplificação nas tarefas

de realização da análise, facilidade de leitura dos resultados e especificidade, além de maior sensibilidade de alguns métodos quando comparados com os métodos convencionais.

Parâmetros como precisão, custo, tempo de análise, aceitabilidade pelos órgãos oficiais, simplicidade de operação, assistência técnica oferecida pelos fabricantes e disponibilidade de espaço no laboratório, devem ser considerados na escolha e implantação de métodos rápidos. Os métodos rápidos mais encontrados no mercado são os para contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*, contagem de bolores e leveduras, detecção de *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* (Hajdenwurcel, 1998).

Um desses novos métodos é o Sistema SimPlate, desenvolvido pela IDEXX Laboratories Inc., o qual visa detectar e quantificar a concentração de microrganismos em alimentos, através da metodologia do Número Mais Provável (NMP), abrangendo os grupos de microrganismos comumente procurados em alimentos, que compreendem os microrganismos mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes totais e coliformes fecais.

## **1.1 Objetivo**

Avaliou-se a qualidade microbiológica de alguns alimentos, a saber: carne bovina, carne suína, frango, lingüiça, peixe, leite bovino cru, iogurte natural, queijo Minas-frescal, fígado bovino, maçã, pêra, tomate, alface, cheiro-verde, repolho, cenoura, beterraba e amendoim, com a finalidade de se comparar o sistema SimPlate com a metodologia convencional na determinação da contagem total de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes totais e coliformes fecais.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Microrganismos indicadores**

A presença de microrganismos em alimentos não significa necessariamente um risco para o consumidor ou uma qualidade inferior destes produtos. Excetuando-se um número reduzido de produtos submetidos à esterilização comercial, os diferentes alimentos podem conter bolores, leveduras, bactérias e outros microrganismos. Muitos alimentos tornam-se potencialmente perigosos ao consumidor somente quando os princípios de sanitização e higiene são violados. Se o alimento tem estado sujeito a condições que poderiam permitir a entrada e/ou crescimento de agentes infecciosos ou toxigênicos, pode se tornar um veículo de transmissão de doenças (ICMSF, 1984).

O exame rotineiro de alimentos para detecção de uma numerosa série de microrganismos patogênicos é impraticável na maioria dos laboratórios devido ao fato de estes estarem inadequadamente equipados. Tem-se, portanto, tornado normal a prática de analisar nos alimentos a existência de bactérias, cuja presença indica a possibilidade da presença de bactérias produtoras de toxinfecções alimentares. Estas bactérias são denominadas microrganismos indicadores e são geralmente considerados como sendo de grande significância quando da avaliação da segurança e qualidade microbiológicas de alimentos (Hayes, 1995).

Microrganismos indicadores são, segundo Franco & Landgraf (1996), grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Como exemplos de microrganismos indicadores podem ser citados aqueles que, segundo a ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), podem ser agrupados em:

1. Microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicrotóxicos e termófilos, contagem de bolores e leveduras.
2. Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais, *Escherichia coli*.

## **2.2 Análise microbiológica**

A análise microbiológica para se verificar quais e quantos microrganismos estão presentes é fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, os riscos que o alimento pode oferecer à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida útil pretendida. Essa análise é indispensável também para verificar se os padrões e especificações microbiológicas para alimentos, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidos adequadamente (Franco & Landgraf, 1996).

Muitos métodos e variações de diferentes métodos que podem ser utilizados para detecção quantitativa e qualitativa de microrganismos em alimentos, estão relatados na literatura. Entretanto, é desejável utilizar métodos que tenham sido aprovados por órgãos reguladores. Estes podem ser métodos padrões ou recomendados. Atualmente esses métodos são comumente divididos em métodos convencionais e métodos rápidos (Franco & Landgraf, 1996; Ray, 1996).

O procedimento a ser empregado é determinado pelo tipo de alimento que está sendo analisado e pelo propósito específico da análise. A escolha pode também depender dos tipos de microrganismos a serem pesquisados em um alimento suspeito de ter causado uma doença (Pelczar Jr. et al., 1997).

Segundo Feng (1995), os métodos rápidos aprovados pelos órgãos oficiais, podem ser utilizados somente para controle, sendo que resultados negativos são considerados como definitivos, mas resultados positivos são considerados presuntivos e devem ser confirmados por métodos padrões.



### **2.2.1 Contagem em placas**

O método de contagem de microrganismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado para contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras, variando-se o tipo de meio, a temperatura e o tempo de incubação (Hajdenwurcel, 1998; Silva et al., 1997).

Por este método, de acordo com Jay (1998) e Swanson et al. (1992), amostras de alimentos são homogeneizadas, diluídas em série, em diluente apropriado, plaqueadas com ou sobre um meio de agar apropriado e incubadas, após o que todas as colônias visíveis são contadas, ou seja, o procedimento se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra irá formar uma colônia separada e visível, quando fixada com meio que lhe permita crescer.

Como as células microbianas podem ocorrer em agrupamentos (pares, tétrades, cachos, cadeias entre outros), não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. A relação correta é feita entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC), que podem ser tanto células individuais como agrupamentos característicos de certos microrganismos, por mililitro ou grama de amostra (Silva et al., 1997).

Franco & Landgraf (1996) relatam que essa metodologia é, certamente a mais utilizada nos laboratórios de análise de alimentos, pois diferentes grupos de microrganismos podem ser enumerados de acordo com o meio de cultura e/ou as condições de incubação (tempo, temperatura e atmosfera) empregadas.

#### **2.2.1.1 Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios**

Esta contagem detecta, em um alimento, o número de bactérias aeróbias ou facultativas e mesófilas (35-37°C), presentes tanto sob a forma vegetativa quanto esporulada (Hayes, 1995; Siqueira, 1995).

Segundo a ICMSF (1984) o número de microrganismos aeróbios mesófilos (contagem em placa) encontrado em um alimento tem sido um dos indicadores

microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizados, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada. Esta determinação permite também obter informação sobre a alteração incipiente dos alimentos, sua provável vida útil, a falta de controle no descongelamento dos alimentos ou desvios na temperatura de refrigeração estabelecida.

### **2.2.1.2 Contagem de bolores e leveduras**

Bolores são os fungos filamentosos, multicelulares, podendo estar presentes no solo, no ar, na água e em matéria-orgânica em decomposição. Leveduras são os fungos não filamentosos, normalmente disseminados por insetos vetores, pelo vento e pelas correntes aéreas (Siqueira, 1995).

A presença de bolores e leveduras viáveis e em índice elevado nos alimentos pode fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem e matéria-prima com contaminação excessiva (Siqueira, 1995).

Segundo o mesmo autor, a contagem de bolores e leveduras é aplicável principalmente, na análise de alimentos ácidos, com pH menor que 4,5, alimentos parcialmente desidratados e farinhas.

### **2.2.2 Técnica do Número Mais Provável**

A técnica do Número Mais Provável, também chamada técnica dos tubos múltiplos, é outra maneira bastante utilizada pelos laboratórios de microbiologia de alimentos para estimar a contagem de alguns tipos de microrganismos, como coliformes totais, coliformes fecais, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (Franco & Landgraf, 1996).

Segundo Peeler et al. (1992) o NMP é estimado de respostas onde resultados são relatados como positivo ou negativo em uma ou mais diluições decimais da amostra. Por exemplo, cinco tubos de meio para cada uma de três diluições são inoculados e

incubados, e produção de gás é observada para cada tubo. Diferentemente da contagem de aeróbios em placas, o NMP não fornece uma medida direta da contagem bacteriana.

O número de microrganismos na amostra original é determinado pelo uso de tabelas de NMP, como a da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1991) (Tabela 1). O método é estatístico na natureza e os resultados de NMP são geralmente maiores que os resultados da contagem padrão em placas (Jay, 1998).

Por esta técnica pode-se obter informações sobre a população presuntiva de coliformes (teste presuntivo), sobre a população real de coliformes (teste confirmativo) e sobre a população de coliformes de origem fecal (coliformes fecais) (Siqueira, 1995).

Tabela 1. Número Mais Provável para várias combinações de resultados positivos, quando três tubos são usados por diluição (inoculações de 1, 0,1 e 0,01 g ou ml da amostra).

Combinação de tubos positivos				Combinação de tubos positivos			
1,0g	0,1g	0,01g	NMP	1,0g	0,1g	0,01g	NMP
0	0	0	<0,3	2	0	0	0,91
0	0	1	0,3	2	0	1	1,4
0	0	2	0,6	2	0	2	2,0
0	0	3	0,9	2	0	3	2,6
0	1	0	0,3	2	1	0	1,5
0	1	1	0,61	2	1	1	2,0
0	1	2	0,92	2	1	2	2,7
0	1	3	1,2	2	1	3	3,4
0	2	0	0,62	2	2	0	2,1
0	2	1	0,93	2	2	1	2,8
0	2	2	1,2	2	2	2	3,5
0	2	3	1,6	2	2	3	4,2
0	3	0	0,94	2	3	0	2,9
0	3	1	1,3	2	3	1	3,6
0	3	2	1,6	2	3	2	4,4
0	3	3	1,9	2	3	3	5,3
1	0	0	0,36	3	0	0	2,3
1	0	1	0,72	3	0	1	3,9
1	0	2	1,1	3	0	2	6,4
1	0	3	1,5	3	0	3	9,5
1	1	0	0,73	3	1	0	4,3
1	1	1	1,1	3	1	1	7,5
1	1	2	1,5	3	1	2	12
1	1	3	1,9	3	1	3	16
1	2	0	1,1	3	2	0	9,3
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	2	2	2,0	3	2	2	21
1	2	3	2,4	3	2	3	29
1	3	0	1,6	3	3	0	24
1	3	1	2,0	3	3	1	46
1	3	2	2,4	3	3	2	11
1	3	3	2,9	3	3	3	>110

Nota: Os valores de NMP são calculados partindo-se de porções iniciais de 1g ou ml da amostra.

Fonte: ABNT (1991) MB-3463

### 2.2.2.1 Coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*

Muitos métodos têm sido utilizados para detectar coliformes. A fermentação da lactose em um meio é o primeiro requerimento para um microrganismo ser considerado um coliforme. O procedimento sugerido pela Food and Drug Administration consiste do uso do método NMP pela inoculação de tubos com caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), sendo a técnica mais utilizada para contagem de bactérias do grupo coliforme. A avaliação dos resultados dá-se via utilização de uma tabela de NMP com intervalo de confiança ao nível de 95% de probabilidade, para as diversas combinações de tubos positivos nas séries de três ou cinco tubos (Banwart, 1989; Silva et al. 1997).

Coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli* são determinados por três passos sucessivos na metodologia determinativa (ICMSF, 1984).

### 2.2.2.2 Coliformes totais

Pertencem a este grupo os gêneros bacterianos *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, incluindo cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato gastrintestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas. Por isso, sua enumeração em água e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração de coliformes fecais ou *E. coli* (Silva et al., 1997).

A principal razão para que sejam agrupados deve-se às suas muitas características comuns. São todos Gram negativos, não formadores de esporos, muitos são móteis, anaeróbios facultativos, resistentes a muitos agentes surfactantes e fermentam lactose produzindo ácido e gás em 48h a 32°C (leite) ou 35-37°C (Ray, 1996).

- **Teste presuntivo para coliformes totais** – O meio de cultura utilizado permite um enriquecimento seletivo dos coliformes, recuperando células injuriadas. Crescimento

com produção de gás no tubo de Durham evidenciam um teste positivo (Hajdenwurcel, 1998).

- **Teste confirmativo para coliformes totais** – O meio de cultura utilizado apresenta sais biliares que inibem o crescimento de microrganismos Gram positivos e a lactose é utilizada como substrato para produção de gás pelos coliformes. Crescimento com produção de gás no tubo de Durham evidenciam um teste positivo (Hajdenwurcel, 1998).

### **2.2.2.3 Coliformes fecais**

A definição é a mesma de coliformes totais, porém 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).

Quando esta análise é efetuada, busca-se a determinação de coliformes de origem gastrintestinal, porém sabe-se que cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* incluídas neste grupo podem apresentar origem não fecal (água, solo e vegetais).

### **2.2.2.4 *Escherichia coli***

Dentre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, dentro do grupo dos coliformes fecais, a *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. Todos os demais membros do grupo têm uma associação duvidosa com a contaminação fecal e *E. coli*, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento (Silva et al. 1997).

Sua presença em alimentos crus é considerada um indicador de contaminação fecal, direta ou indireta. A contaminação fecal direta ocorre durante o processamento de matérias-primas de origem animal e devido à falta de higiene pessoal dos manipuladores. A contaminação indireta pode ocorrer através de águas poluídas e de

esgoto. Em alimentos processados pelo calor sua presença é vista com grande preocupação (Ray, 1996).

- **Teste para coliformes fecais** – O meio de cultura utilizado é seletivo para microrganismos Gram negativos em função da presença de sais biliares. A temperatura de incubação (44,5-45,5°C) permite evidenciar a presença de coliformes fecais, pois eles apresentam a capacidade de fermentação da lactose com produção de gás a temperaturas mais elevadas. A produção de gás ocorre nos tubos de fermentação (Hajdenwurcel, 1998).

Alíquotas de tubos que apresentarem resultados positivos para coliformes fecais e/ou tubos positivos para coliformes totais devem ser semeadas com alça de platina através de estrias na superfície do meio de cultura Eosina Azul de Metileno, desenvolvido por Levine. Colônias características de *E. coli* (nucleadas, com centro preto e brilho verde metálico) devem ser isoladas e submetidas às provas bioquímicas do IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato), segundo Hajdenwurcel (1998).

As desvantagens principais desta metodologia são o tempo requerido para todas estas etapas de identificação da *E. coli* e a quantidade de vidrarias necessárias.

### 2.3 O sistema SimPlate

O Sistema SimPlate foi desenvolvido pelos Laboratórios IDEXX para a determinação de bactérias aeróbias, coliformes totais, *E. coli* e bolores e leveduras, em alimentos, pela metodologia do Número Mais Provável. Apresenta-se na forma de “kit” comercial e se constitui de placas plásticas descartáveis prontas para uso em dois tamanhos, a normal com 84 cavidades separadas para incubação, com uma contagem máxima de 738 NMP e a com 198 cavidades, com contagem máxima de 1659 NMP (Townsend & Naqui, 1998). O meio de cultura é liofilizado, devendo apenas ser reidratado com um diluente estéril, geralmente água destilada esterilizada. Alíquotas das amostras preparadas são pipetadas e colocadas no centro das placas SimPlate, e em

seguida cobertas com o meio hidratado. O líquido é distribuído para as cavidades individuais de incubação, o excesso de líquido é retirado fazendo-se a drenagem para uma esponja lateral disposta na placa e em seguida as placas são colocadas em estufa. O resultado se dá via conversão através de uma tabela de NMP fornecida pelo fabricante.

### **2.3.1 Tabela de NMP para o sistema SimPlate**

Townsend & Naqui (1998) informam que a tabela foi construída seguindo-se os mesmos princípios matemáticos de métodos tradicionais de NMP de três ou cinco tubos. Entretanto, segundo os mesmos pesquisadores, a tabela do sistema SimPlate é mais acurada que as dos métodos NMP tradicionais, em função do artifício do grande número de cavidades de incubação (84 ou 198). A relação entre o número de cavidades positivas e o NMP final não é linear, mas é originada no princípio matemático da distribuição de Poisson, que neste caso, diz respeito à distribuição de microrganismos nas cavidades do SimPlate. O número total de cavidades presentes em cada placa determina seu limite máximo de contagem e o número de cavidades positivas determina o NMP (Tabela 2).



Tabela 2. Tabela de Número Mais Provável para SimPlate – Contagem Normal.

Cavidades Positivas	NMP	Cavidades Positivas	NMP	Cavidades Positivas	NMP	Cavidades Positivas	NMP				
1	=	2	22	=	50	43	=	120	64	=	240
2	=	4	23	=	54	44	=	124	65	=	248
3	=	6	24	=	56	45	=	128	66	=	256
4	=	8	25	=	58	46	=	132	67	=	266
5	=	10	26	=	62	47	=	136	68	=	276
6	=	12	27	=	64	48	=	142	69	=	288
7	=	14	28	=	68	49	=	146	70	=	298
8	=	16	29	=	70	50	=	150	71	=	312
9	=	18	30	=	74	51	=	156	72	=	324
10	=	22	31	=	76	52	=	160	73	=	338
11	=	24	32	=	80	53	=	166	74	=	354
12	=	26	33	=	84	54	=	172	75	=	372
13	=	28	34	=	86	55	=	178	76	=	392
14	=	30	35	=	90	56	=	184	77	=	414
15	=	32	36	=	94	57	=	190	78	=	440
16	=	36	37	=	96	58	=	196	79	=	470
17	=	38	38	=	100	59	=	202	80	=	508
18	=	40	39	=	104	60	=	208	81	=	556
19	=	42	40	=	108	61	=	216	82	=	624
20	=	46	41	=	112	62	=	224	83	=	738
21	=	48	42	=	116	63	=	232	84	>	738

Fonte: Laboratórios IDEXX (s.d.)

### 2.3.2 SimPlate contagem total

É utilizado para a detecção e quantificação da concentração total de bactérias no alimento. Este método é baseado na tecnologia de substrato enzimático múltiplo que correlaciona atividade enzimática com a presença de bactérias viáveis no alimento. A detecção microbiana ocorre quando o substrato é hidrolisado por enzimas microbianas produzindo um composto azul fluorescente, o 4-metilumbeliferona (4-MU). Este composto pode ser visualizado através da exposição do meio de cultura a lâmpada UV (365nm), após 24h de incubação a 35°C (Figura 1) (Hajdenwurcel, 1998).



Figura 1 – SimPlate contagem total.

Fonte: Hajdenwurcel (1998)

Nem todas as bactérias têm cada uma destas enzimas ativas, mas pressupõe-se que elas tenham ao menos uma. A atividade de somente uma enzima bacteriana é suficiente para a detecção ocorrer (Townsend & Naqui, 1998).

Para a inoculação e leitura as bactérias do alimento são suspensas no meio e dispostas nas cavidades, onde atividades bioquímicas, e não crescimento em colônias, determinam se bactérias viáveis estão presentes. A detecção por este processo bioquímico é que torna o período de incubação relativamente curto, porque são necessárias menos bactérias para produzir um sinal detectável em uma cavidade do que são requeridas para formar uma colônia claramente visível (Townsend & Naqui, 1998). Esta base também é válida para a detecção de coliformes totais, *E. coli* e bolores e leveduras.

Townsend & Naqui (1998) verificaram a eficácia do sistema SimPlate TPC para enumeração da concentração total de bactérias em alimentos, comparando-o ao plaqueamento convencional para contagem total de bactérias mesófilas. Uma análise de regressão simples dos dados mostrou forte correlação entre os métodos ( $r=0,96$ ).

Este estudo foi realizado sob supervisão da Association of Official Analytical Chemists Research Institute (AOAC) e o sistema SimPlate recebeu a “**Performance Tested Certification**” (Smith & Townsend, 1999).

### 2.3.3 SimPlate bolores e leveduras

Aqui também o princípio do método está baseado na utilização de substrato enzimático múltiplo, correlacionando a atividade enzimática com a presença de fungos (bolores e leveduras) viáveis no alimento.

Constituintes do meio inibem o crescimento bacteriano. A atividade de enzimas múltiplas fúngicas resulta em fluorescência sob iluminação ultravioleta (Spangenberg & Ingham, 2000). As cavidades fluorescentes sob luz UV de 365nm (Figura 2) devem ser contadas e transformadas em NMP de bolores e leveduras pelo uso da tabela própria (Tabela 2).



Figura 2 – SimPlate bolores e leveduras.

Fonte: IDEXX (s.n.t.)

### 2.3.4 SimPlate coliformes totais e *E. coli*

Este método é baseado na tecnologia de substrato definido que correlaciona a presença de coliformes totais e *E. coli* com a presença de  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glicuronidase, respectivamente. O composto vermelho clorofenol  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (CRPG), quando hidrolisado pela enzima  $\beta$ -galactosidase, produz o composto vermelho clorofenol (CRP) que possui coloração laranja a púrpura e o composto 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glicuronídeo (MUG), quando hidrolisado pela enzima  $\beta$ -glicuronidase, produz o composto 4-metilumbeliferona (4-MU) que apresenta cor azul fluorescente quando exposto à luz UV a 365nm (Figura 3) (Hajdenwurcel, 1998).

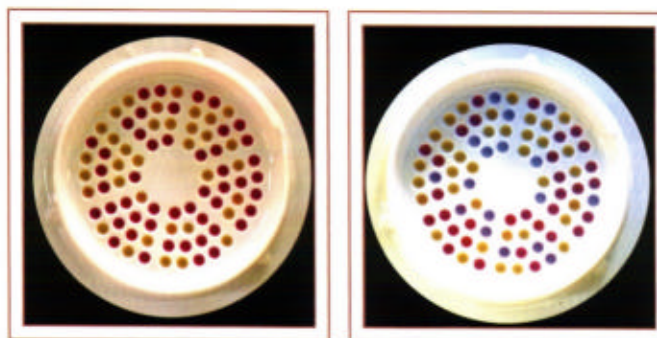


Figura 3 – SimPlate coliformes totais (esquerda) e *E. coli* (direita).

Fonte: Hajdenwurcel (1998)

Estas reações químicas são observadas após um tempo médio de cultivo, em estufa, de 24h a 35°C e quantifica populações de coliformes totais e *E. coli* em alimentos, sem a necessidade de um passo confirmativo. O meio de crescimento foi formulado para suprimir o crescimento de bactérias não-coliformes (Townsend et al. 1998).

O número de cavidades coloridas (laranja a púrpura) em cada placa é registrado como positivo para coliformes. As cavidades que fluorescem azul quando expostas a comprimento de onda ultravioleta (365nm) são registradas como positivas para *E. coli* (Townsend et al. 1998).

Também a tabela própria de número mais provável (Tabela 2) deve ser consultada para se expressar o resultado como NMP de coliformes totais e de *E. coli* por grama ou mililitro de alimento.

Townsend et al. (1998) relatam que estudos internos realizados nos Laboratórios IDEXX, para comparação do sistema SimPlate para enumeração de coliformes e *E. coli* em alimentos com a técnica de tubos múltiplos (três tubos) mostraram forte correlação entre si ( $r=0,91$ ).

### **2.3.5 Principais vantagens do sistema SimPlate**

Dentre algumas vantagens apresentadas pelo Sistema SimPlate estão a facilidade para o preparo, ou seja, adição do meio liofilizado em água destilada esterilizada, dispensando a esterilização do meio e sua pesagem; não há a necessidade de se adicionar ajustadores de pH ou antibióticos (para bolores e leveduras) assim como não há necessidade de preparação de agar; facilidade para ser executado, com adição do meio e amostra na placa e incubação por 24 h (mesófilos aeróbios, coliformes totais e *E. coli*) e por 48 h para bolores e leveduras; partículas de alimentos não necessitam ser filtradas; a ampla faixa de contagem reduz a necessidade de diluições, sem sacrificar a sensibilidade; não ocorrência de espalhamentos; facilidade para interpretar pois as cavidades fluorescentes são facilmente contadas sob luz UV; a contagem é rápida e mais fácil, sem sacrificar a precisão (Beuchat et al., 1998; IDEXX, s.d.; IDEXX, 1996).

### **2.3.6 Algumas desvantagens do sistema SimPlate**

Por se tratar essencialmente de uma técnica de NMP, não se pode determinar os números reais de unidades de colônias que se formaram, assim como a predominância de um microrganismo específico não pode ser distinguida. Alguns alimentos, como fígado, farinha de trigo, nozes, iogurte, contém enzimas que causam a fluorescência do meio ocasionando um resultado falso-positivo (Beuchat et al., 1998). De maneira geral

não é indicado pelo fabricante promover análise microbiológica com produtos obtidos através de uma cultura “starter”.

Cerca de 94% de *E. coli*, incluindo muitas cepas anaerogênicas, produzem a enzima  $\beta$ -glicuronidase. Cerca de 6% de cepas de *E. coli*, incluindo cepas entero-hemorrágicas, não a produzem (Hitchins et al., 1992), o que torna inviável a detecção destas últimas pelo sistema.

## 2.4 Padrões e legislação

Segundo Hayes (1995) a legislação em relação a alimentos foi originalmente introduzida em muitos países para prevenir a venda de produtos fraudulentos e objetivando verificar desvios nos padrões para composição e peso. Somente em tempos mais recentes a legislação sofreu expansão e incluiu considerações de saúde pública, tais como aquelas referentes à transmissão de bactérias nocivas em alimentos.

Padrões e regulamentos têm sido desenvolvidos para assegurar que o alimento recebido pelo consumidor seja saudável, seguro e apresente a qualidade especificada na lei (Pelczar Jr. et al., 1997).

No Brasil, a Resolução RDC nº 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), de 2 de Janeiro de 2001 estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano.

Em relação aos alimentos analisados no presente trabalho, os padrões microbiológicos da referida resolução, estabelecem:

- Frutas frescas, “in natura”, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto:
  - coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $5,0 \times 10^2$ /g
- Hortaliças (legumes e similares) frescas, “in natura”, preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto:
  - coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $10^2$ /g

- Raízes, tubérculos e similares, frescas, “in natura”, preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas), refrigeradas ou congeladas, para consumo direto:
  - coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $10^3/g$
- Amendoim, cru, inteiro ou descascado:
  - coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $10^3/g$
- Carnes resfriadas, ou congeladas, “in natura”, de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes):
  - coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $10^4/g$
- Embutidos frescos (lingüiças cruas e similares):
  - coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $5,0 \times 10^3/g$
- Queijo frescal:
  - coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $5,0 \times 10^3/g$
- Iogurte (leite fermentado):
  - coliforme de origem fecal (NMP): máximo de 10/ml

O Código sanitário do Estado de São Paulo (São Paulo, 1992) determina, para alguns alimentos analisados no presente trabalho, que as características microbiológicas sejam as seguintes:

- Frutas:
  - bactérias do grupo coliforme de origem fecal: máximo,  $10^2/g$  (padrão para morangos)
- Verduras (que compreendem as hortaliças de folhas):
  - bactérias do grupo coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $2,0 \times 10^2/g$
- Legumes (que compreendem frutos ou as sementes de diferentes espécies de plantas, principalmente as leguminosas):
  - bactérias do grupo coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $2,0 \times 10^2/g$
- Raízes, tubérculos e rizomas:
  - bactérias do grupo coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $2,0 \times 10^2/g$
- Carnes (bovina, suína, frango) (cruas, preparadas ou não, miúdos):

- contagem padrão em placas: máximo,  $3,0 \times 10^6$  UFC/g
- bactérias do grupo coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $3,0 \times 10^2$ /g
- Carnes frescas preparadas embutidas:
  - contagem padrão em placas: máximo,  $10^6$  UFC/g
  - bactérias do grupo coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $10^2$ /g
  - bolores e leveduras: máximo,  $10^3$  UFC/g
- Pescado eviscerado:
  - contagem padrão em placas: máximo,  $3,0 \times 10^6$  UFC/g
  - bactérias do grupo coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $10^2$ /g
- Queijo Minas-frescal:
  - bactérias do grupo coliforme de origem fecal (NMP): máximo,  $10^2$ /g

Segundo a Resolução RDC nº 12 (ANVISA, 2001), para a interpretação dos resultados, comparam-se os valores encontrados nas análises realizadas com os valores estabelecidos. De acordo com essa comparação tem-se:

- Produtos em condições sanitárias satisfatórias (são aqueles cujos resultados analíticos estão abaixo ou igual aos limites estabelecidos).
- Produtos em condições sanitárias insatisfatórias (são aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos e/ou demonstram a presença ou a quantificação de outros microrganismos patogênicos ou toxinas).

De acordo com as recomendações da referida Resolução, as seguintes conclusões podem ser emitidas:

- Produto ou lote de acordo com os padrões legais vigentes, quando os resultados obtidos estiverem dentro dos limites estabelecidos.
- Produto ou lote impróprio para o consumo humano; citar o(s) resultado(s) analítico(s) e o(s) parâmetro(s) não atendido(s).
- Produto ou lote impróprio para o consumo humano por apresentar microrganismo patogênico ou toxina que representa perigo severo à saúde humana.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem

As amostras foram constituídas de nove alimentos de origem vegetal e nove alimentos de origem animal (Quadro 1), a saber:

<b>Origem Animal</b>	<b>Origem Vegetal</b>
Carne bovina (Coxão mole)	Maçã
Frango (Peito)	Pera
Carne suína (Lombo)	Tomate
Lingüiça mista frescal	Alface
Peixe (Pescada)	Cheiro-verde (salsa e cebolinha)
Fígado bovino	Repolho
Leite bovino cru	Cenoura
Queijo Minas-frescal	Beterraba
Iogurte Natural	Amendoim

Quadro 1 - Alimentos utilizados nas análises microbiológicas.

As amostras foram obtidas no comércio de Piracicaba-SP da maneira como estavam expostas para a comercialização; o peixe estava eviscerado e descabeçado; o cheiro-verde, individualizado em embalagens plásticas; o amendoim cru, em embalagem plástica de 500g. A exceção foi o leite bovino, que foi obtido no Departamento de Produção Animal (Zootecnia dos Ruminantes–Leiteria) da ESALQ-USP. Imediatamente após a aquisição, as amostras foram transportadas nas próprias embalagens comerciais

para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP e analisadas.

Foram efetuadas análises, tanto convencionais, como pela metodologia SimPlate, sendo realizadas três repetições analíticas para cada alimento, totalizando 54 amostras de alimentos analisados.

### **3.2 Preparo das amostras**

No laboratório foram pesadas alíquotas de 50 gramas ou pipetadas alíquotas de 50 mililitros, assepticamente, que foram adicionadas a 450 mililitros de diluente, neste caso água peptonada 0,1% esterilizada (Diagnolab 713495) e homogeneizadas em liquidificador esterilizado, obtendo-se assim a diluição  $10^{-1}$ . A seguir foram feitas diluições decimais seriadas. A diluição  $10^{-2}$  foi obtida retirando-se 10 mililitros da diluição  $10^{-1}$  e adicionando-os a 90 mililitros de água peptonada 0,1% em frascos de diluição. As demais diluições subseqüentes foram obtidas de maneira similar, transferindo-se 10 mililitros da diluição precedente para frascos com 90 mililitros de água peptonada 0,1%.

Na obtenção de cada diluição os frascos foram devidamente agitados de acordo com a literatura, de maneira vigorosa e invertendo-os 25 vezes em arco de 30 cm (Silva et al., 1997).

### **3.3 Análises e meios de cultura**

Meios de cultura específicos para cada grupo de microrganismos tanto para a metodologia convencional como para o SimPlate, foram utilizados nas análises.

### 3.3.1 Metodologia convencional

#### 3.3.1.1 Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios

Para a determinação de bactérias mesófilas o meio de cultura utilizado foi o Plate Count Agar (PCA) ou Agar Padrão para contagem e o sistema foi o de semeadura em profundidade.

Neste caso foi utilizado seu equivalente comercial OXOID CM 325, cujos componentes estão relacionados no Quadro 2.

<b>Composição</b>	
Triptona	5,0g
Extrato de levedura	2,5g
Dextrose	1,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000ml

Quadro 2 - Constituintes do meio de cultura Agar Padrão para Contagem.

Fonte: Food and Drug Administration (FDA) (1995)

O alimento preparado foi analisado pipetando-se alíquotas de 1 mililitro de cada diluição para placas de Petri esterilizadas, fazendo de cada diluição placas em duplicata; em seguida foram vertidos cerca de 15 a 20 ml de agar fundido e resfriado a 44-46°C. Depois de agitadas em movimentos circulares para promover a homogeneização, esperou-se o tempo de solidificação do agar para serem invertidas e incubadas. As placas foram colocadas em estufa a 35-37°C por 48 h.

Transcorrido o tempo de incubação fez-se a contagem do número de colônias, com o auxílio de um contador de colônias (Phoenix EC-589), das duplicatas que apresentaram número entre 30 e 300 UFC; multiplicou-se a média aritmética das duplicatas pelo respectivo fator de diluição. Os resultados foram expressos em UFC/g ou ml de alimento.

### 3.3.1.2 Contagem de bolores e leveduras

O meio de cultura utilizado foi o Batata Dextrose Agar (BDA). Nesta análise usou-se o equivalente comercial OXOID CM 139 (Quadro 3) acidificado (pH 3,5-4,0) com ácido tartárico 10%. O ácido foi adicionado no momento da realização da análise ao meio basal já fundido e resfriado.

<b>Composição</b>	
Infusão de batatas	200,0g
Dextrose	20,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000ml

Quadro 3 - Componentes do meio de cultura Batata Dextrose Agar.

Fonte: FDA (1995)

O procedimento para inoculação das amostras e posterior contagem, neste caso, foi similar ao apresentado para contagem total de mesófilos, variando-se apenas a temperatura e o período de incubação, 30°C por 3-5 dias.

### 3.3.1.3 Número Mais Provável de coliformes totais e coliformes fecais

#### - Teste presuntivo

O meio de cultura empregado foi o Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). O equivalente comercial OXOID CM 451 foi utilizado, cujos componentes são apresentados no Quadro 4, e a ele se acrescentou um indicador de condições ácidas, a púrpura de bromocresol (Merck), na concentração de 0,001% para o caldo de concentração simples e 0,002% para o caldo de concentração dupla.

<b>Composição</b>	
Triptose	20,0g
Lactose	5,0g
Fosfato monopotássico	2,75g
Fosfato dipotássico	2,75g
NaCl	5,0g
Lauril sulfato de sódio	5,0g
Água destilada	1000ml

Quadro 4 - Componentes do Caldo Lauril Sulfato Triptose.

Fonte: FDA (1995)

Séries de três tubos contendo Caldo LST foram inoculadas sendo utilizados três tubos com 20 ml de meio (concentração dupla) mais 10 ml da amostra, para a diluição  $10^{-1}$ , três tubos com 10 ml de meio (concentração simples) mais 1 ml de amostra, para a diluição  $10^{-1}$  e demais diluições. Após a inoculação os tubos foram incubados em estufa a 35-37°C por 48 h.

Os tubos com LST com formação de gás no tubo de Durhan e produção de ácido evidenciado pela formação de cor amarela foram presuntivamente considerados positivos.

#### **- Teste confirmativo para coliformes totais**

Alíquotas dos tubos considerados positivos foram inoculadas, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, em Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% (CVBLB), DIFCO 0007 (Quadro 5), para a confirmação de coliformes totais, com incubação a 35-37°C por 24-48 h.

Após esse período foram considerados positivos os tubos com produção de gás no tubo de Durhan. Os resultados foram baseados na proporção de tubos confirmados que exibiram produção de gás para as três diluições consecutivas, e expressos como NMP de coliformes totais/g ou ml de amostra, após consulta à tabela própria (Tabela 1).

<b>Composição</b>	
Bile de boi (“oxgall”)	20,0g
Peptona	10,0g
Lactose	10,0g
Verde brilhante (13,3ml de solução aquosa 0,1%)	0,0133g
Água destilada	1000ml

Quadro 5 - Componentes do Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2%.

Fonte: FDA (1995)

### - Teste confirmativo para coliformes fecais

Da mesma maneira que na confirmação de coliformes totais, alíquotas de tubos positivos no Caldo LST foram inoculadas em Caldo *E. coli* (Caldo EC), utilizando-se o equivalente comercial DIFCO 0314 (Quadro 6).

<b>Composição</b>	
Triptose	20,0g
Lactose	5,0g
Sais biliare nº 3	1,5g
Fosfato dipotássico	4,0g
Fosfato monopotássico	1,5g
Cloreto de sódio	5,0g
Água destilada	1000ml

Quadro 6 - Componentes do Caldo EC.

Fonte: FDA (1995)

Os tubos foram incubados em banho-maria a 44,5°C por 24-48 h. Os tubos com produção de gás nos tubos de Durham foram considerados positivos para coliformes fecais. Os resultados foram expressos como NMP/g ou ml de alimento após terem sido consideradas as três últimas séries com tubos positivos e posterior consulta à tabela (Tabela 1).

### **3.3.2 Sistema SimPlate**

Para a análise dos alimentos com o sistema SimPlate foram utilizados “kits” comerciais para contagem total de mesófilos, bolores e leveduras e coliformes totais e *E. coli*, constituídos de placas com 84 cavidades para inoculação e meios liofilizados.

As cavidades que apresentaram fluorescência foram observadas com ajuda de uma câmara de análise de fluorescência da marca Spectroline CM-10, com luz UV de 365nm.

#### **3.3.2.1 Contagem total**

O substrato, constituído por 2,6g de meio liofilizado, foi reidratado em 100 ml de água destilada esterilizada, provendo meio suficiente para 10 placas na contagem normal. Foi colocado 1 mililitro de cada diluição do alimento no centro da placa (duplicata) e em seguida 9 mililitros do substrato, chegando-se ao valor total de 10 mililitros. Após distribuição, através de movimentos circulares, do meio e amostra por todas as cavidades e desprezo do excesso de líquido, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 h. As cavidades que apresentaram fluorescência sob luz UV 365nm, foram consideradas positivas, fazendo-se a média das duplicatas e expressando o resultado como NMP/g ou ml de alimento, após consulta à tabela do fabricante (Tabela 2).

#### **3.3.2.2 Contagem de bolores e leveduras**

O substrato liofilizado, com aproximadamente 5,0g, foi reidratado em 100ml de água destilada esterilizada. A inoculação se deu de maneira similar ao apresentado no item 3.3.2.1. As placas, não invertidas foram incubadas em estufa a 30°C por 48 h. As cavidades positivas foram contadas após esse período, também considerando as fluorescentes quando expostas à luz UV 365nm e expressando o resultado como NMP/g ou ml do alimento, após consulta à tabela própria (Tabela 2).

### 3.3.2.3 Contagem de coliformes totais e *E. coli*

Os procedimentos para inoculação seguiram os mesmos padrões das análises anteriores. O substrato, com 2,6g, foi reidratado em 100 ml de água destilada esterilizada. As placas, após a inoculação, foram invertidas e incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Após esse período promoveu-se a leitura dos resultados, onde as cavidades que apresentaram coloração de laranja a púrpura foram consideradas positivas para coliformes totais e dessas cavidades, as que apresentaram fluorescência sob luz UV (365nm) foram consideradas positivas para *Escherichia coli*. Os resultados foram expressos como NMP/g ou ml de alimento para coliformes totais e *E. coli*, após consulta à tabela (Tabela 2).

### 3.4 Avaliação dos resultados

Os resultados das análises microbiológicas, para contagem de mesófilos aeróbios (UFC/g ou ml), contagem de bolores e leveduras (UFC/g ou ml) e coliformes totais e fecais (NMP/g ou ml), nas metodologias convencionais e os valores de NMP/g ou ml obtidos pelo SimPlate para os mesmos grupos microbianos foram transformados em valores  $\log_{10}$ /g ou ml e avaliados através do teste F da Análise da Variância, no delineamento inteiramente ao acaso, como análise conjunta reunindo os alimentos. Os resultados foram também avaliados através de uma análise de regressão simples com utilização do Microsoft Excel 2000. O nível de significância adotado foi de 5% de probabilidade para ambos os casos.



## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Contagem total de mesófilos aeróbios**

#### **4.1.1 Análise microbiológica e estatística**

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos nas análises microbiológicas para contagem total de mesófilos aeróbios por ambas as metodologias.

A Tabela 4 contém o teste F da análise da variância para os dados transformados de mesófilos aeróbios. Nesta análise não foram considerados os resultados do queijo e iogurte por não terem apresentado contagem na análise pelo SimPlate, além do fígado bovino por não ser recomendada sua análise através do SimPlate.

Tabela 3. Microrganismos mesófilos aeróbios em alimentos.

CONTAGEM			CONTAGEM		
Alimento	PCA	SimPlate	Alimento	PCA	SimPlate
	UFC/g ou ml	NMP/g ou ml		UFC/g ou ml	NMP/g ou ml
Carne Bovina	9,3x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>	Maçã	1,2x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>
A1	8,7x10 <sup>5</sup>	3,2x10 <sup>3</sup>	A10	1,2x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>
	8,6x10 <sup>5</sup>	3,6x10 <sup>3</sup>		1,1x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>
Carne Suína	1,7x10 <sup>3</sup>	6,4x10 <sup>2</sup>	Pera	2,4x10 <sup>3</sup>	6,0x10 <sup>2</sup>
A2	1,9x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>3</sup>	A11	2,3x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>
	1,6x10 <sup>3</sup>	8,4x10 <sup>3</sup>		2,2x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>
Frango	2,4x10 <sup>6</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>	Tomate	7,7x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>
A3	2,0x10 <sup>6</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>	A12	8,8x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>
	3,0x10 <sup>6</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>		9,0x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>
Lingüiça	3,0x10 <sup>5</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	Alface	1,3x10 <sup>7</sup>	2,7x10 <sup>5</sup>
A4	2,9x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>4</sup>	A13	3,4x10 <sup>7</sup>	4,1x10 <sup>5</sup>
	3,0x10 <sup>5</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>		2,1x10 <sup>7</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>
Peixe	8,6x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	Cheiro verde	3,4x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>
A5	8,9x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	A14	3,5x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>
	9,5x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>		4,0x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>
Fígado	2,9x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>4</sup>	Repolho	8,8x10 <sup>3</sup>	5,1x10 <sup>3</sup>
A6	2,7x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>4</sup>	A15	8,3x10 <sup>3</sup>	5,6x10 <sup>3</sup>
	2,9x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>		8,5x10 <sup>3</sup>	5,1x10 <sup>3</sup>
Leite cru	6,9x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	Cenoura	1,7x10 <sup>5</sup>	6,2x10 <sup>4</sup>
A7	5,4x10 <sup>3</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	A16	1,7x10 <sup>5</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>
	5,6x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>		2,2x10 <sup>5</sup>	6,2x10 <sup>4</sup>
Queijo	4,9x10 <sup>3</sup>	ND	Beterraba	1,2x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>
A8	4,7x10 <sup>3</sup>	ND	A17	2,1x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>
	5,2x10 <sup>3</sup>	ND		9,5x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>
Iogurte	6,5x10 <sup>4</sup>	ND	Amendoim	4,7x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>
A9	6,2x10 <sup>4</sup>	ND	A18	8,8x10 <sup>2</sup>	6,0x10 <sup>3</sup>
	6,3x10 <sup>4</sup>	ND		1,0x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>

Tabela 4. Análise da variância e teste F para mesófilos aeróbios.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Alimento	14	107.03665	7.64547	716.93	0.0001
Tratamento	1	9.51483	9.51483	892.22	0.0001
Alim*Trat	14	13.26793	0.94771	88.87	0.0001
Resíduo	60	0.63985	0.01066		
Total	89	130.45926			

C.V. 2.301521

Pode-se observar que houve significância ao nível de 5% de probabilidade entre os métodos utilizados (tratamentos) para mesófilos aeróbios. A interação alimentos x métodos também foi significativa, no mesmo nível de probabilidade, indicando que houve diferença entre os tratamentos aplicados (métodos) em função do tipo de alimento analisado. Quando os dois grupos de alimentos, vegetais e animais foram analisados separadamente, notou-se uma maior interferência nos resultados dos métodos para alimentos de origem animal, onde um F de 146,35 foi obtido para a interação e um F de 54,06 para a interação alimentos de origem vegetal e métodos. As médias de métodos submetidas ao teste t-Student ( $p < 0,05$ ) estão na Tabela 5. Em apenas dois casos, maçã e beterraba, não houve diferença significativa entre as metodologias.

Com relação a alimentos, a significância era esperada uma vez que a carga microbiana, em quantidade e tipo, varia bastante de alimento para alimento.

Campregher (2000) encontrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre PCA e SimPlate em apenas uma das quatro marcas de sucos de laranja analisadas.

Tabela 5. Teste t-Student para médias de métodos (mesófilos aeróbios).

ALIMENTOS	MÉTODOS	
	PCA	SimPlate
Carne bovina	5,9475 a	3,4219 b
Carne suína	3,2361 a	2,8585 b
Frango	6,3808 a	4,7843 b
Lingüiça	5,4683 a	4,6148 b
Peixe	4,9538 a	4,6728 b
Leite cru	3,7731 a	3,2743 b
Maçã	5,0575 a	5,0570 a
Pêra	3,3607 a	2,6607 b
Tomate	3,9284 a	3,2035 b
Alface	7,3177 a	5,5004 b
Cheiro-verde	6,5592 a	6,1778 b
Repolho	3,9309 a	3,7189 b
Cenoura	5,2689 a	4,8194 b
Beterraba	4,1254 a	4,2018 a
Amendoim	2,8721 a	3,4600 b

Médias de métodos seguidas de mesma letra (linha) não diferem entre si pelo teste tStudent ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados transformados das análises microbiológicas para contagem de mesófilos foram submetidos a uma análise de regressão (Figura 4), com exceção do fígado bovino, pelos motivos anteriormente citados e do queijo e do iogurte, por não ter havido detecção de microrganismos mesófilos totais por um dos métodos, neste caso, o SimPlate.

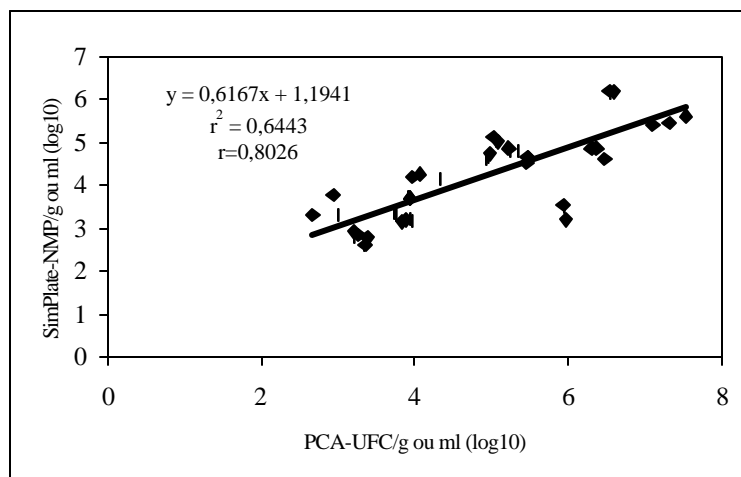


Figura 4 – Análise de regressão dos dados de mesófilos aeróbios.

Nas condições do presente trabalho obteve-se um fator de correlação de 0,80, entre os dados obtidos nas contagens em PCA e pelo sistema SimPlate. Esse valor foi inferior aos valores encontrados por Beuchat et al. (1998), que em estudos interlaboratoriais, obtiveram fatores de correlação de 0,96 e 0,97 entre os resultados obtidos com SimPlate e PCA, na enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios em alimentos. Beloti (2000), analisando leite pasteurizado (A, B e C), obteve um fator de correlação de 0,718, com as mesmas metodologias. Os resultados com SimPlate que foram obtidos após 24h de incubação a 35°C corresponderam aos resultados com PCA após 48h de incubação, à mesma temperatura.

Os resultados microbiológicos obtidos na presente pesquisa foram, quando possível, comparados com padrões legais (federais e estaduais) estabelecidos.

O Código sanitário do Estado de São Paulo (São Paulo, 1992) estabelece  $3,0 \times 10^6$  UFC/g como valor máximo para contagem microbiana total em placa para carne bovina, carne suína, frango, fígado e pescado eviscerado e  $10^6$  UFC/g, para lingüiça.

Para os alimentos que não contêm padrões estabelecidos para contagem microbiana total, sabe-se que alimentos destinados ao consumo humano com populações microbianas da ordem de  $10^6$  UFC/g ou ml devem ser considerados no mínimo suspeitos, pois aumenta a possibilidade de estarem presentes deterioradores e/ou patógenos, podem ocorrer descaracterizações organolépticas, perdas do valor nutricional

e da atratividade do alimento. No entanto, tais considerações não são válidas quando o alimento é obtido pela ação microbiana (crescimento/fermentação). Franco & Landgraf (1996) relatam que quando ocorrem alterações detectáveis a maioria dos alimentos apresenta números superiores a  $10^6$  UFC/g ou ml do alimento.

#### 4.1.1.1 Alimentos de origem animal

- **Carne bovina** – As amostras analisadas apresentaram valores abaixo do padrão estabelecido como máximo pelo Código sanitário (São Paulo, 1992) para mesófilos aeróbios, mas pelo PCA, as leituras apresentaram contagens em níveis de  $10^5$  UFC/g, já bastante próximas de  $10^6$  UFC/g. Foram contagens altas que deixam o alimento muito próximo de ser considerado suspeito. Já pelo sistema SimPlate as contagens foram bem menores, em níveis de  $10^3$  UFC/g, o que colocariam o produto em ótimas condições sob o ponto de vista microbiológico.

Rossi Jr. et al. (1990) encontraram em carne bovina mecanicamente separada, contagens de  $8,1 \times 10^3$  UFC/g (desossa manual em mesa) e  $6,9 \times 10^3$  UFC/g (desossa manual aérea), enquanto que Hoffmann et al. (1998) encontraram para carne bovina moída contagens de  $1,0 \times 10^3$  a  $4,6 \times 10^3$  UFC/g. Esses valores estão mais próximos dos obtidos pelo SimPlate e são inferiores aos obtidos pela metodologia convencional, no presente trabalho.

- **Carne suína** – As amostras analisadas tiveram baixas contagens, em níveis de  $10^3$  UFC/g pelas duas metodologias e, portanto, ambas colocam o produto em acordo com os padrões legais vigentes.

Comparando-se esses resultados com os obtidos por Hoffmann et al. (1998), verifica-se que as contagens de mesófilos aeróbios estão no limite inferior das contagens obtidas por esses pesquisadores que encontraram, em análises com carne suína, valores que variaram de  $2,1 \times 10^3$  a  $3,5 \times 10^8$  UFC/g e se encontram abaixo dos valores obtidos por Fuzihara & Franco (1993), de  $7,2 \times 10^4$  a  $2,1 \times 10^6$  UFC/g e dos obtidos por Calderon & Furlanetto (1990), cujos resultados variaram de  $5,4 \times 10^4$  a  $6,7 \times 10^7$  UFC/g.

- **Frango** – As amostras analisadas tiveram, em PCA, uma das leituras atingindo o valor estipulado como máximo tolerado ( $3,0 \times 10^6$  UFC/g) e as demais leituras também foram em níveis de  $10^6$  UFC/g, o que colocaria o alimento como suspeito, o que não ocorreu quando analisado pelo sistema SimPlate, onde as contagens foram em níveis de  $10^4$  NMP/g, consideradas adequadas para o produto em questão.

Os resultados obtidos pela metodologia convencional estão acima dos obtidos por Hoffmann et al. (1995), cujas contagens variaram de  $5,8 \times 10^3$  a  $2,3 \times 10^4$  UFC/g, estando os valores obtidos pelo SimPlate próximos do valor máximo obtido pelos citados pesquisadores.

- **Fígado bovino** – As contagens de mesófilos aeróbios pelas duas metodologias se encontraram abaixo do limite estabelecido como padrão máximo tolerado.

Segundo o fabricante este não é um alimento indicado para ser avaliado pelo sistema SimPlate, uma vez que este contém enzimas que são capazes de induzir a fluorescência.

Os valores encontrados no presente trabalho são inferiores aos encontrados por Gomes & Furlanetto (1987) para o mesmo alimento, cujas análises geraram valores que variaram de  $4,5 \times 10^5$  a  $2,8 \times 10^7$  UFC/g; mas são superiores aos de Hanna et al., citados pelos mesmos autores, que analisando fígado de bovinos recém-adquirido obtiveram contagem de  $2,4 \times 10^2$  UFC/g.

- **Lingüiça** – As amostras analisadas se enquadraram no limite máximo estabelecido pelo Código sanitário (São Paulo, 1992) que é de  $10^6$  UFC/g, por ambas as metodologias com contagens em níveis de  $10^5$  UFC/g pelo PCA e em níveis de  $10^4$  NMP/g pelo SimPlate.

Os valores aqui obtidos são inferiores aos encontrados nas análises realizadas por Sabioni et al. (1999), onde 82% das amostras excederam a  $10^6$  UFC/g e aos obtidos por Falcão et al., citados por Sabioni et al. (1999), onde 90% das amostras excederam a  $10^6$  UFC/g.

- **Peixe** – As contagens foram em níveis de  $10^4$  UFC-NMP/g por ambas as metodologias, colocando as amostras analisadas em acordo com os padrões legais vigentes.

Vieira et al. (2000) encontraram valores inferiores na contagem de mesófilos aeróbios para tilápia recém-capturada, com variação de  $3,0 \times 10^3$  UFC/g a  $9,8 \times 10^3$  UFC/g.

- **Leite cru** – Embora as contagens obtidas por ambas as metodologias utilizadas tenham sido em níveis de  $10^3$  UFC/ml, o que coloca o produto como de ótima qualidade microbiológica para leite cru, considerando que são valores tolerados para leite tipos A e B pasteurizados, aqui também os valores encontrados pela metodologia convencional, com plaqueamento em PCA, foram superiores aos encontrados para o sistema SimPlate.

Estes valores são inferiores aos de Costa et al. (1984) que, em leite cru obtido por ordenha manual, observaram contagens de  $8,3 \times 10^4$  UFC/ml e  $5,5 \times 10^4$  UFC/ml quando o leite foi obtido por ordenha mecânica. Já Antunes & Oliveira (1986), avaliando a qualidade microbiológica de leite cru, obtiveram contagens que variaram de  $5,0 \times 10^3$  a  $7,0 \times 10^7$  UFC/ml em tipo B cru e variação de  $1,5 \times 10^4$  a  $9,7 \times 10^7$  UFC/ml para leite tipo C cru.

- **Queijo e Iogurte** – Como são produtos obtidos pela ação fermentativa de bactérias, a contagem total de microrganismos não expressa a qualidade microbiológica do alimento. Mas comparando-se os resultados das duas metodologias, o sistema SimPlate não detectou atividade microbiana em nenhum desses dois alimentos analisados, enquanto que pelo PCA houve detecção de crescimento de microrganismos mesófilos aeróbios em níveis de  $10^3$ - $10^4$  UFC/g. Há necessidade de mais pesquisas envolvendo esses dois alimentos para se ter certeza a respeito da metodologia, ou seja, se de fato o sistema SimPlate não se prestaria a alimentos que são obtidos pela ação fermentativa de bactérias.

Garcia-Cruz et al. (1994) encontraram para queijo Minas-frescal contagens acima dos valores aqui obtidos,  $5,0 \times 10^5$  UFC/g.



Hoffmann et al. (1997), na contagem total de mesófilos em iogurte natural, obtiveram números elevados,  $6,0 \times 10^{12}$  UFC/ml, muito acima dos obtidos no presente trabalho.

#### 4.1.1.2 Alimentos de origem vegetal

- **Maçã** – Ambas as metodologias utilizadas mostraram contagens com valores próximos de  $1,0 \times 10^5$  UFC-NMP/g, mostrando uma elevada contaminação microbiana, oriunda provavelmente da casca do fruto, que não foi retirada nem higienizada, para a análise.

- **Pera** – Aqui as contagens por ambas as metodologias foram baixas ( $10^2$ - $10^3$  UFC-NMP/g), com valores superiores quando utilizada a metodologia convencional.

- **Tomate** – As contagens foram da ordem de  $10^3$  UFC-NMP/g por ambos os métodos, colocando o produto em boas condições microbiológicas, quanto a este parâmetro analisado.

- **Alface** – Para as amostras analisadas, no caso do PCA, as leituras foram da ordem de  $10^7$  UFC/g, o que colocaria o alimento como suspeito e no SimPlate,  $10^5$  NMP/g, que seria considerada contagem normal. Foi o alimento que apresentou o maior nível de contaminação em PCA e a segunda maior contaminação no SimPlate.

Ambos os métodos apresentaram contagens que se enquadram dentro da faixa de valores encontrados por Riser et al. (1984) para contagens de mesófilos aeróbios em alface, ou seja,  $3,8 \times 10^4$  a  $2,3 \times 10^8$  UFC/g. Mas considerando-se os resultados obtidos por Vázquez et al. (1997),  $1,2 \times 10^6$  a  $4,7 \times 10^8$  UFC/g, as contagens pelo SimPlate foram inferiores.

- **Cheiro-verde** – As contagens foram da ordem de  $10^6$  UFC/g-NMP/g por ambos os métodos empregados, o que torna esse alimento suspeito devido a alta carga

microbiana. Pelo SimPlate, foi o alimento que apresentou o maior nível de contaminação e, em PCA, o segundo.

- **Repolho** – As amostras analisadas foram consideradas em boas condições microbiológicas por ambas as metodologias ( $10^3$  UFC-NMP/g). Para este alimento, ocorreu o desenvolvimento de coloração acinzentada nas cavidades das placas do SimPlate logo após a inoculação, dificultando bastante a leitura da fluorescência.

Keipper & Fred, citados por Splittstoesser (1970), obtiveram valores que variaram de  $4,0 \times 10^3$  a  $2,0 \times 10^6$  UFC/g para contagem total de mesófilos em repolho.

- **Cenoura** – Os valores obtidos pelo PCA ( $10^5$  UFC/g) são condizentes com o valor obtido por Vaughn (1951) que encontrou uma contagem de  $4,4 \times 10^5$  UFC/g para cenoura; já os obtidos pelo SimPlate foram inferiores ( $10^4$  NMP/g).

- **Beterraba** – Por ambos os métodos as contagens foram em níveis de  $10^4$  UFC-NMP/g. Pelo sistema SimPlate as placas da diluição  $10^{-1}$  tiveram alteração na intensidade da fluorescência em função da presença de betacianinas, grupo de pigmentos naturais da beterraba, que alterou a coloração do meio de amarelo para vermelho, o que dificultou muito a interpretação dos resultados. Neste substrato, ora a metodologia convencional em PCA, ora o sistema SimPlate, apresentava contagens microbianas maiores.

O valor de  $3,2 \times 10^6$  UFC/g, para contagem total em beterraba, foi relatado por Vaughn (1951), valor este bem acima dos encontrados neste trabalho.

- **Amendoim** – As contagens foram baixas ( $10^2$ - $10^3$  UFC-NMP/g) pelas duas metodologias. Esse alimento apresentou problemas na análise pelo SimPlate. Nas placas da diluição  $10^{-1}$ , cerca de 10 minutos após a inoculação houve alteração na coloração do meio, de amarelo claro para uma coloração acinzentada. Esse escurecimento dificultou a leitura da fluorescência, o que pode ter comprometido a precisão dos resultados. Neste

caso, as contagens pelo SimPlate foram sempre superiores às encontradas pela metodologia convencional em PCA.

Na contagem total de mesófilos, dentre os alimentos que possuem padrões estabelecidos, todos se encontraram abaixo dos limites máximos, em ambas as metodologias utilizadas.

Os maiores níveis de contaminação foram observados na alface pelo PCA, sendo que as contagens foram dois ciclos logarítmicos acima das contagens pelo SimPlate.

Pelo SimPlate, os maiores níveis de contaminação foram observados no cheiro-verde, que apresentou contagens no mesmo ciclo logarítmico em PCA.

Quando a metodologia convencional, através do plaqueamento em PCA, foi utilizada, a maioria dos alimentos analisados apresentou contagens de mesófilos aeróbios maiores do que aquelas encontradas quando o sistema SimPlate foi utilizado, fato que reforça a hipótese de que a recuperação das células ou UFC em PCA é melhor do que no sistema SimPlate. Este fato também foi observado por Beloti (2000).

## **4.2 Contagem de bolores e leveduras**

### **4.2.1 Análise microbiológica e estatística**

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos nas análises microbiológicas para bolores e leveduras pelo BDA e pelo SimPlate.

A Tabela 7 contém o teste F da análise da variância para bolores e leveduras. Aqui não foram considerados os resultados do iogurte e do tomate por não terem apresentado contagens; do leite e do repolho, por não apresentarem contagens pelo SimPlate e também do fígado, já que o fabricante do sistema não indica sua análise por este método. Houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os métodos em função dos alimentos analisados bem como na interação alimentos x métodos. Para o grupo de alimentos de origem animal o F foi 76,89 e para o grupo de alimentos de origem vegetal foi 235,86, portanto, tendo tido este grupo maior influência

na diferença entre os resultados obtidos pelos métodos. As médias das contagens dos alimentos para cada método, comparadas através do teste t-Student ( $p < 0,05$ ), se encontram na Tabela 8. Por este teste os seguintes alimentos não apresentaram diferença entre as metodologias empregadas: lingüiça, peixe, cheiro-verde e beterraba.

Tabela 6. Bolores e leveduras em alimentos.

CONTAGEM			CONTAGEM		
Alimento	BDA	SimPlate	Alimento	BDA	SimPlate
	UFC/g ou ml	NMP/g ou ml		UFC/g ou ml	NMP/g ou ml
Carne Bovina	4,3x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	Maçã	0,5x10 <sup>1</sup>	7,4x10 <sup>3</sup>
A1	4,8x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	A10	1,5x10 <sup>1</sup>	7,4x10 <sup>3</sup>
	3,7x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>		1,0x10 <sup>1</sup>	7,4x10 <sup>3</sup>
Carne Suína	5,1x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	Pera	1,5x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>2</sup>
A2	5,4x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	A11	1,6x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>
	5,1x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>		1,5x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>
Frango	2,9x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	Tomate	ND	ND
A3	2,4x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	A12	ND	ND
	2,7x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>		ND	ND
Lingüiça	2,2x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	Alface	2,7x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>
A4	2,5x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	A13	2,8x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>
	2,7x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>		2,6x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>
Peixe	4,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	Cheiro verde	3,0x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>
A5	8,0x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	A14	2,4x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>
	9,0x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>		2,1x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>
Fígado	6,7x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>3</sup>	Repolho	0,5x10 <sup>1</sup>	ND
A6	6,5x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>3</sup>	A15	1,0x10 <sup>1</sup>	ND
	6,3x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>		0,5x10 <sup>1</sup>	ND
Leite cru	0,5x10 <sup>1</sup>	ND	Cenoura	3,9x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>
A7	1,5x10 <sup>1</sup>	ND	A16	3,9x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>
	0,5x10 <sup>1</sup>	ND		3,6x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>2</sup>
Queijo	2,6x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	Beterraba	3,3x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>
A8	2,9x10 <sup>4</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	A17	6,5x10 <sup>2</sup>	6,0x10 <sup>2</sup>
	3,0x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>2</sup>		7,5x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>
Iogurte	ND	ND	Amendoim	4,3x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>
A9	ND	ND	A18	4,7x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>
	ND	ND		6,0x10 <sup>2</sup>	6,0x10 <sup>3</sup>

Tabela 7. Análise da variância e teste F para bolores e leveduras.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Alimento	12	53.58057	4.46504	336.32	0.0001
Tratamento	1	2.23385	2.23385	168.26	0.0001
Alim*Trat	12	29.87355	2.48946	187.51	0.0001
Resíduo	52	0.69037	0.01327		
Total	77	86.37835			

C.V.3.827019

Tabela 8. Teste t-Student para médias de métodos (bolores e leveduras).

ALIMENTOS	MÉTODOS	
	BDA	SimPlate
Carne bovina	3,6374 a	3,1082 b
Carne suína	2,7158 a	2,3010 b
Frango	3,4246 a	3,1642 b
Lingüiça	2,3905 a	2,3010 a
Peixe	1,8197 a	1,5017 a
Queijo	4,4541 a	2,7045 b
Maçã	0,9583 a	3,8680 b
Pêra	3,1826 a	2,1431 b
Alface	6,3540 a	4,1310 b
Cheiro-verde	3,3931 a	3,5017 a
Cenoura	3,5794 a	2,0944 b
Beterraba	2,7354 a	2,4600 a
Amendoim	2,6945 a	3,6607 b

Médias de métodos seguidas de mesma letra (linha) não diferem entre si pelo teste tStudent ao nível de 5% de probabilidade.

Campregher (2000) não encontrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre BDA acidificado e SimPlate quando analisou sucos de laranja por estes métodos.

Os dados obtidos nas análises microbiológicas para bolores e leveduras, exceto os dados dos alimentos que não apresentaram contagens por ambos os métodos (iogurte e tomate), além dos que não apresentaram contagens pelo SimPlate (leite e repolho) e do fígado, pelas razões já expostas, foram submetidos a uma análise de regressão e foi obtido um fator de correlação de 0,68 (Figura 5). Este valor é inferior ao encontrado por Spangenberg & Ingham (2000), que analisando bolores e leveduras em queijo mozzarella, encontraram um coeficiente de correlação de 0,79, quando compararam o sistema SimPlate com BDA mais antibiótico, considerando-o baixo. Taniwaki et al. (2001) analisando bolores e leveduras em onze diferentes alimentos obtiveram um coeficiente de correlação que demonstrou não ter havido equivalência entre os resultados de SimPlate e BDA mais antibiótico, com diferença significativa observada para a maioria dos alimentos analisados.

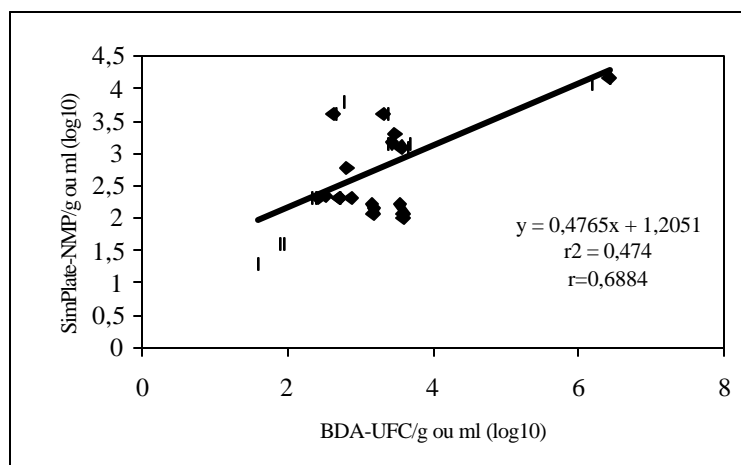


Figura 5 – Análise de regressão dos dados de bolores e leveduras.

Em relação a bolores e leveduras, o Código sanitário (São Paulo, 1992) determina limite apenas para lingüiça, com máximo de  $10^3$  UFC/g.

#### 4.2.1.1 Alimentos de origem animal

- **Carne bovina** – As contagens encontradas por ambas a metodologias utilizadas apresentaram valores da ordem de  $10^3$  UFC-NMP/g para estas amostras.

Estes estão acima dos valores médios obtidos por Rossi Jr. et al. (1990), para bolores e leveduras em carne bovina mecanicamente separada, que foram de  $5,9 \times 10^2$  UFC/g (desossa manual em mesa) e  $6,2 \times 10^2$  UFC/g (desossa manual aérea). Analisando carne bovina moída Hoffmann et al. (1998) obtiveram contagens que variaram de  $7,0 \times 10^1$  a  $2,4 \times 10^2$  UFC/g, inferiores às obtidas nesta pesquisa.

- **Carne suína** – As contagens de bolores e leveduras para as amostras analisadas de carne suína foram baixas por ambas metodologias ( $10^2$  UFC-NMP/g).

Os resultados correspondem aos valores mínimos encontrados por Hoffmann et al. (1998), cujos valores, para carne suína, variaram de  $6,7 \times 10^2$  a  $1,3 \times 10^5$  UFC/g.

- **Frango** – Aqui ambas as metodologias apresentaram valores da ordem de  $10^3$  UFC-NMP/g para bolores e leveduras.

Hoffmann et al. (1995) encontraram contagens variando de  $7,0 \times 10^2$  a  $5,0 \times 10^3$  UFC/g, estando próximas às encontradas no presente trabalho.

- **Fígado bovino** – Em níveis de contaminação, foi o segundo alimento mais contaminado por bolores e leveduras, quando analisado pela metodologia convencional em BDA ( $10^4$  UFC/g) e apenas o quarto pelo SimPlate ( $10^3$  NMP/g).

Estes valores podem ser considerados elevados em comparação aos resultados obtidos por Tanaka et al. (1997) que não detectaram crescimento de bolores e leveduras em fígado bovino.

- **Lingüiça** – As contagens para bolores e leveduras, em BDA e pelo SimPlate, foram em níveis de  $10^2$  UFC/g estando, portanto, abaixo do valor estabelecido como limite máximo pelo Código sanitário (São Paulo, 1992), colocando o produto em boas condições microbiológicas, para este parâmetro.

Sabioni et al. (1999) obtiveram em 90% das amostras de lingüiça frescal analisadas contagens de bolores e leveduras abaixo de  $10^6$  UFC/g, enquanto que Tanaka



et al. (1997) não detectaram bolores e leveduras em três amostras de lingüiça suína analisadas.

- **Peixe** – As contagens de bolores e leveduras para estas amostras foram baixas por ambas as metodologias utilizadas, com leituras em níveis de  $10^1$  UFC-NMP/g.

- **Leite cru** – As contagens de bolores e leveduras em leite cru foram muito baixas pelo BDA e não houve detecção pelo SimPlate. Para leite cru geralmente a contaminação é bacteriana e bolores e leveduras ocorrem raramente ou em baixos números (Richter et al. 1992).

- **Queijo** – As amostras analisadas, pelo BDA, apresentaram contagens com dois ciclos logarítmicos acima dos valores encontrados pelo SimPlate.

Nascimento et al. (1985) encontraram em queijo Minas-frescal contagens altas de bolores e leveduras, variando de  $4,4 \times 10^5$  a  $3,8 \times 10^7$  UFC/g.

Já Garcia-Cruz et al. (1994) encontraram contagens menores de bolores e leveduras, com valores que variaram desde ausência (queijo microtexturizado) até  $2,0 \times 10^4$  e  $6,0 \times 10^4$  UFC/g (queijos industriais), correspondentes aos valores em BDA aqui observados.

- **Iogurte** – Não houve detecção de bolores e leveduras por nenhuma das metodologias utilizadas, colocando as amostras analisadas em excelentes condições microbiológicas para a contagem de fungos.

Hoffmann et al. (1997) detectaram  $1,0 \times 10^1$  UFC de bolores e leveduras/ml em iogurte natural, ou seja, valores bastante baixos.

De acordo com Moreira (1998) o controle de bolores e leveduras em iogurtes, ou a sua presença em números baixos, é de importância fundamental uma vez que a população destes microrganismos é que irá determinar a vida útil deste produto. Segundo Richter et al. (1992) bolores e leveduras são os microrganismos mais

predominantes envolvidos na deterioração de produtos lácteos fermentados, por tolerarem o baixo pH normal do produto.

#### 4.2.1.2 Alimentos de origem vegetal

- **Maçã** – Pelo SimPlate houve maior detecção de bolores e leveduras (níveis de  $10^3$  NMP/g) do que pelo BDA ( $10^1$  UFC/g). Mas mesmo assim o nível de contaminação foi baixo, considerando-se que se trata de uma fruta e, segundo Brackett & Splittstoesser (1992), os altos teores de ácido e açúcar das frutas geralmente permitem a predominância de bolores e leveduras.

- **Pera** – Aqui as leituras em BDA ( $10^3$  UFC/g) foram maiores que as do SimPlate ( $10^2$  NMP/g), e em ambos os casos podem ser consideradas contagens baixas de bolores e leveduras para fruta “in natura”.

- **Tomate** – Não ocorreu a detecção de fungos nestas amostras, tanto em BDA quanto pelo SimPlate.

A não ocorrência de fungos neste tipo de alimento, com pH baixo, pode indicar a presença de resíduos de defensivos químicos utilizados durante sua produção, que estariam inibindo o crescimento de fungos. Deve-se considerar também tratamentos pós-colheita pelos quais produtos vegetais podem passar, como limpeza, aplicação de ceras bem como cultivares mais resistentes.

- **Alface** – Este alimento apresentou o maior nível de contaminação pelas duas metodologias, com contagens em BDA da ordem de  $10^6$  UFC/g e, pelo SimPlate, da ordem de  $10^4$  UFC/g.

Riser et al. (1984) encontraram em alface contagens de bolores e leveduras que variaram de  $8,1 \times 10^2$  a  $2,3 \times 10^6$  UFC/g estando os valores encontrados neste trabalho dentro dessa faixa por ambas as metodologias.

- **Cheiro-verde** – As amostras analisadas apresentaram contagens semelhantes, no mesmo ciclo logarítmico ( $10^3$ ), por ambas as metodologias, com boa correlação entre elas.

- **Repolho** – Para o repolho as contagens de bolores e leveduras foram muito baixas pelo BDA e não ocorreu detecção pelo SimPlate, o que é de se estranhar para este tipo de substrato.

- **Cenoura** – Aqui também a metodologia convencional (BDA) apresentou contagens maiores de bolores e leveduras ( $10^3$  UFC/g) em relação ao SimPlate ( $10^2$  NMP/g).

- **Beterraba** – Aqui as contagens de bolores e leveduras foram em níveis de  $10^2$  UFC-NMP/g por ambas as metodologias.

A beterraba possui um grupo de pigmentos, as betacianinas, com coloração vermelha. Estes pigmentos tornaram a observação de ocorrência ou não de fluorescência nas placas da diluição  $10^{-1}$  (SimPlate) impossível.

- **Amendoim** – A contagem de bolores e leveduras foi maior pelo SimPlate, da ordem de  $10^3$  NMP/g, em relação ao BDA, com leituras em níveis de  $10^2$  UFC/g.

As placas da diluição  $10^{-1}$  apresentaram crescimento e espalhamento de micélio por toda a superfície das placas do SimPlate, encobrindo as cavidades, tornando impossível a individualização e a leitura da fluorescência.

Na contagem de bolores e leveduras, o único alimento com padrão estabelecido, a lingüiça, apresentou contagens inferiores às toleradas pelo Código sanitário (São Paulo, 1992).

Aqui, o alimento que apresentou os maiores níveis de contaminação por bolores e leveduras foi a alface por ambas as metodologias, com o BDA tendo apresentado resultados de dois ciclos logarítmicos acima dos encontrados pelo SimPlate.

De maneira geral, com pouquíssimas exceções, as contagens em BDA foram maiores que no SimPlate, parecendo haver uma maior recuperação das células ou UFC em BDA do que no SimPlate. A maçã e o amendoim foram os únicos alimentos que apresentaram contagens de fungos maiores pelo sistema SimPlate do que pelo método convencional em BDA. Contagens maiores pelo BDA em relação ao SimPlate também foram encontradas por Spangenberg & Ingham (2000) analisando queijo mozzarella.

As placas de SimPlate para bolores e leveduras, segundo os fabricantes, não devem ser invertidas para incubação. Devido a isso houve grande condensação de vapor d'água na parte inferior das tampas das placas. Após 48 horas de incubação, esse líquido acumulado na tampa caía sobre o meio e amostra inoculados, dificultando a leitura da fluorescência. Tal fato parece ser bastante negativo para a precisão dos resultados, porém não se encontraram relatos de tal problema por outros pesquisadores que utilizaram este método. Talvez seja pelo fato de existirem ainda poucos trabalhos com o uso do sistema SimPlate. Spangenberg & Ingham (2000) relatam o fato do sistema SimPlate não ter apresentado fluorescência marcante quando analisaram bolores e leveduras em queijo mozzarella.

### **4.3 Contagem de coliformes totais**

#### **4.3.1 Análise microbiológica e estatística**

Os dados obtidos nas análises microbiológicas, por ambas as metodologias, para coliformes totais estão apresentados na Tabela 9.

Na análise estatística dos dados obtidos para coliformes totais não foram considerados os seguintes alimentos: maçã, peixe e repolho por não terem apresentado contagens pelos tubos múltiplos e apenas pelo SimPlate e queijo e iogurte por não terem apresentado contagens por ambos os métodos, além do fígado bovino, pois sua análise pelo SimPlate não é recomendada pelos fabricantes do sistema.

Na Tabela 10 é apresentado o teste F da análise da variância, onde se pode observar que houve significância ao nível de 5% de probabilidade entre os métodos

utilizados. A interação alimentos x métodos também foi significativa, no mesmo nível de probabilidade, indicando que houve diferença entre os métodos em função do alimento analisado. Houve uma menor influência na interação entre os alimentos de origem animal, onde um F de 11,48 foi obtido; já para os alimentos de origem vegetal o F foi de 29,83 para a interação.

As médias de métodos submetidas ao teste tStudent ( $p < 0,05$ ) se encontram na Tabela 11. Neste caso em seis alimentos, carne suína, frango, lingüiça, leite cru, pêra e tomate, os métodos não apresentaram diferença entre si, tendo, portanto, o mesmo comportamento.

Tabela 9. Microrganismos coliformes totais em alimentos.

CONTAGEM			CONTAGEM		
Alimento	3 Tubos	SimPlate	Alimento	3 Tubos	SimPlate
	UFC/g ou ml	NMP/g ou ml		UFC/g ou ml	NMP/g ou ml
Carne Bovina	2,4x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	Maçã	ND	2,0x10 <sup>2</sup>
A1	2,4x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	A10	ND	2,0x10 <sup>2</sup>
	4,6x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>3</sup>		ND	4,0x10 <sup>2</sup>
Carne Suína	1,1x10 <sup>2</sup>	8,8x10 <sup>1</sup>	Pera	9,3x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>
A2	1,1x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	A11	2,4x10 <sup>2</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>
	1,1x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>		9,3x10	2,0x10
Frango	4,3x10 <sup>3</sup>	5,1x10 <sup>3</sup>	Tomate	9,3	2,0x10 <sup>1</sup>
A3	3,9x10 <sup>3</sup>	4,7x10 <sup>3</sup>	A12	2,4x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>
	2,3x10 <sup>3</sup>	4,4x10 <sup>3</sup>		9,3	2,0x10 <sup>1</sup>
Lingüiça	1,1x10 <sup>2</sup>	1,6x10 <sup>2</sup>	Alface	2,4x10 <sup>6</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>
A4	1,1x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	A13	3,4x10 <sup>6</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>
	4,6x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>		2,4x10 <sup>6</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>
Peixe	ND	1,6x10 <sup>3</sup>	Cheiro verde	2,4x10 <sup>5</sup>	8,4x10 <sup>3</sup>
A5	ND	6,2x10 <sup>2</sup>	A14	2,4x10 <sup>5</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>
	ND	5,8x10 <sup>2</sup>		2,4x10 <sup>5</sup>	6,2x10 <sup>4</sup>
Fígado	4,6x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	Repolho	ND	4,0x10 <sup>2</sup>
A6	1,1x10 <sup>4</sup>	6,0x10 <sup>2</sup>	A15	ND	8,0x10 <sup>2</sup>
	4,6x10 <sup>3</sup>	6,0x10 <sup>2</sup>		ND	4,0x10 <sup>2</sup>
Leite cru	2,4x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>	Cenoura	1,1x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>
A7	4,6x10 <sup>2</sup>	2,2x10 <sup>2</sup>	A16	4,6x10 <sup>3</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>
	4,6x10 <sup>2</sup>	3,2x10 <sup>2</sup>		1,1x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>
Queijo	ND	ND	Beterraba	1,1x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>
A8	ND	ND	A17	1,1x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>
	ND	ND		1,1x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>
Iogurte	ND	ND	Amendoim	2,4x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>
A9	ND	ND	A18	1,5x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>
	ND	ND		2,4x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>

Tabela 10. Análise da variância e teste F para coliformes totais.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob.>F
Alimento	11	132.20382	12.01853	294.36	0.0001
Tratamento	1	1.48406	1.48406	36.35	0.0002
Alim*Trat	11	9.88595	0.89872	22.01	0.0001
Resíduo	48	1.95949	0.04083		
Total	71	145.53362			

C.V.6.54520

Em análises realizadas por Muratori et al. (2000) com tilápias provenientes de piscicultura, também houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para coliformes totais e *E. coli* entre SimPlate e tubos múltiplos, tendo o sistema Simplate detectado valores superiores em ambos os casos. Apesar dessa diferença, os pesquisadores consideraram o SimPlate um método eficiente para contagem de coliformes totais e *E. coli*. Já Campregher (2000) não encontrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as metodologias (tubos múltiplos e SimPlate) quando analisou coliformes totais em sucos de laranja.

Tabela 11. Teste t-Student para médias de métodos (coliformes totais).

ALIMENTOS	MÉTODOS	
	Tubos Múltiplos	SimPlate
Carne bovina	4,4743 a	3,3385 b
Carne suína	2,0413 a	1,7024 a
Frango	3,5287 a	3,6738 a
Lingüiça	1,9151 a	1,8027 a
Leite cru	2,5685 a	2,5034 a
Pêra	2,1057 a	1,6830 a
Tomate	1,1057 a	1,3010 a
Alface	6,3802 a	4,7015 b
Cheiro-verde	5,3802 a	4,5291 b
Cenoura	3,9151 a	4,6625 b
Beterraba	3,1238 a	4,6625 b
Amendoim	1,3121 a	2,3010 b

Médias de métodos seguidas de mesma letra (linha) não diferem entre si pelo teste tStudent ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores obtidos nas análises microbiológicas para coliformes totais também foram submetidos a um a análise de regressão (Figura 6), excetuando-se os dados das análises da maçã, peixe e repolho, por não terem apresentado contagens pelos tubos múltiplos, iogurte e queijo, por não ter havido contagens por ambos os métodos, além do fígado, por motivo anteriormente citado. Foi obtido um bom fator de correlação de 0,88, mas inferior ao encontrado por Townsend et al. (1998) que obtiveram um fator de correlação de 0,91 em análises, para coliformes totais, de 98 amostras de alimentos. Beloti (2000) não encontrou correlação entre os de dados coliformes totais em leite pasteurizado (tipos A, B e C), utilizando SimPlate e CVBLB.



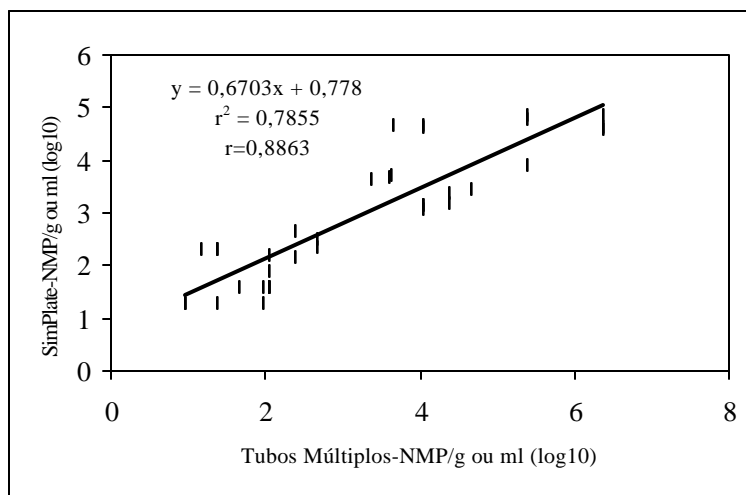


Figura 6 – Análise de regressão dos dados de coliformes totais.

Analisando coliformes totais em leite cru, através dos tubos múltiplos e do SimPlate, Hajdenwurcel & Souza (1998) encontraram um coeficiente de correlação de 0,549. Quando se tratou de leite pasteurizado o coeficiente de correlação foi de 0,75.

Estes pesquisadores relatam o fato de que a metodologia dos tubos múltiplos emprega resultados com amplas faixas de limite de confiança, tornando esta avaliação estatística inadequada.

Não existem padrões legais nacionais para a presença de coliformes totais para os alimentos analisados. Os limites estabelecidos dizem respeito ao NMP de coliformes fecais no produto.

#### 4.3.1.1 Alimentos de origem animal

- **Carne bovina** – As contagens de coliformes totais foram maiores pelos tubos múltiplos, em níveis de  $10^4$  NMP/g, do que pelo SimPlate,  $10^3$  NMP/g.

Hoffmann et al. (1998), para carne bovina moída, encontraram de 4,0 NMP a  $7,5 \times 10^1$  NMP/g nas amostras analisadas. A carne tem sua carga microbiana aumentada à medida que passa por novos cortes ou picagem e, portanto, os valores encontrados no

presente trabalho para amostras de carne bovina em um só corte são considerados altos quando comparados aos valores encontrados pelos pesquisadores citados.

Rossi et al. (1990) também encontraram contagens inferiores para coliformes totais,  $5,9 \times 10^1$  NMP/g (desossa em mesa) e  $3,5 \times 10^1$  NMP/g (desossa aérea).

Boa parte das amostras de carne bovina analisadas por Tanaka et al. (1997), 44,2%, tiveram os valores compreendidos entre  $10^1$  e  $10^3$  NMP/g, enquanto que em 40,4% os valores foram acima de  $10^3$  NMP/g, valores próximos aos encontrados no presente trabalho.

- **Carne suína** – As contagens de coliformes totais foram em níveis de  $10^2$  NMP/g para os tubos múltiplos e em níveis de  $10^1$  NMP/g pelo SimPlate.

Os valores obtidos no presente trabalho se encontram entre os menores valores obtidos por Fuzihara & Franco (1993) que encontraram para carne suína valores que variaram de  $1,5 \times 10^1$  a  $1,1 \times 10^6$  NMP/g e os obtidos por Calderon & Furlanetto (1990),  $9,3 \times 10^1$  a  $2,1 \times 10^6$  NMP/g.

- **Frango** – As amostras analisadas apresentaram contagens de coliformes totais em níveis de  $10^3$  NMP/g por ambas as metodologias.

Tais valores foram superiores aos obtidos por Hoffmann et al. (1995) que estiveram dentro do intervalo de 9,0 NMP a  $9,3 \times 10^1$  NMP/g, porém mais próximos dos maiores valores obtidos por Vieira & Teixeira (1997) em carcaças de frango resfriadas,  $2,3 \times 10^1$  a  $2,4 \times 10^3$  NMP/g.

- **Fígado bovino** – As contagens pelos tubos múltiplos foram de  $10^3$ - $10^4$  NMP/g e as contagens obtidas pelo SimPlate foram em níveis de  $10^2$  NMP/g. Neste caso, esperava-se que as contagens pelo SimPlate fossem maiores, em função do citado na literatura (IDEXX, s.d.).

As contagens de coliformes totais obtidas por ambas as metodologias se enquadram nos valores observados por Gomes & Furlanetto (1987) para fígado bovino, que variaram de  $9,0 \times 10^1$  a  $2,4 \times 10^5$  NMP/g; com a grande maioria das amostras, 88%,

apresentando valores superiores a  $10^2$  NMP/g e 46%, valores compreendidos entre  $10^3$ - $10^4$  NMP/g.

Analisando o mesmo produto, Tanaka et al. (1997) encontraram que das três amostras analisadas, apenas uma apresentou contagem acima de  $10^3$  NMP/g.

- **Lingüiça** – As contagens de coliformes totais variaram de  $10^1$ - $10^2$  NMP/g por ambas as metodologias, podendo ser consideradas baixas, pois se trata de um produto bastante manipulado.

Estes valores estão enquadrados na faixa encontrada por Vasconcelos & Iaria (1991),  $2,3 \times 10^1$  a  $9,3 \times 10^4$  NMP/g para lingüiças.

Sabioni et al. (1999), avaliando lingüiça frescal (30 amostras), encontraram que 86% delas apresentaram contagens de coliformes totais inferiores a  $10^5$  NMP/g, enquanto que Tanaka et al. (1997) relatam que uma das três amostras de lingüiça suína por eles analisadas apresentou contagem acima de  $10^3$  NMP/g.

- **Peixe** – Neste caso não houve detecção de coliformes totais pelos tubos múltiplos e detecção variando de  $10^2$  a  $10^3$  NMP/g pelo sistema Simplate.

Esta mesma faixa de contagem de coliformes totais foi obtida por Vieira et al. (2000), com amostras de filé de tilápias coletadas em três pontos: no local de filetagem, congelados no frigorífico e congelados no posto de venda.

- **Leite cru** – Ambas as metodologias apresentaram valores da ordem de  $10^2$  NMP/g.

Barros et al. (1984) observaram valores para coliformes totais entre  $3,6 \times 10^3$  e  $1,1 \times 10^6$  NMP/ml, acima dos valores encontrados neste trabalho, enquanto que Antunes & Oliveira (1986) obtiveram variações entre  $1,2 \times 10^2$  e  $1,6 \times 10^5$  UFC/ml.

- **Queijo e Iogurte** – Para ambos os alimentos não ocorreram detecções de coliformes totais pelos dois métodos utilizados. Mesmo não se tendo padrões para

comparação, os produtos podem ser considerados em excelentes condições microbiológicas para este parâmetro.

Para o queijo, a ausência de coliformes totais está de acordo com o encontrado por Garcia-Cruz et al. (1994), para queijo microtexturizado; já para duas amostras de queijo industrial não ocorreu o mesmo, uma vez que as contagens foram superiores a  $1,1 \times 10^3$  NMP/g. Nascimento et al. (1985) encontraram também desde ausência até o valor máximo de  $1,1 \times 10^8$  NMP/g.

Para o iogurte, Hoffmann et al. (1997) também encontraram ausência de coliformes totais em iogurte natural.

Segundo Richter et al. (1992) coliformes, se presentes, declinam rapidamente após a fabricação do iogurte, devido ao pH ácido do produto.

#### 4.3.1.2 Alimentos de origem vegetal

- **Maçã** – Aqui o sistema SimPlate conseguiu detectar a presença de coliformes totais em níveis de  $10^2$  NMP/g, enquanto que pelos tubos múltiplos não houve detecção.

- **Pera** – As amostras analisadas apresentaram contagens na faixa de  $10^1$ - $10^2$  NMP/g por ambas as metodologias, ou seja, valores bem baixos.

- **Tomate** – Tanto a metodologia dos tubos múltiplos quanto o sistema SimPlate apresentaram contagens muito baixas de coliformes totais neste alimento, mas as contagens pelo SimPlate foram mais constantes.

- **Alface** – A alface foi o alimento que apresentou o maior nível de contaminação pelos tubos múltiplos,  $2,4 \times 10^6$  NMP de coliformes totais/g (em todas as leituras) e no sistema SimPlate, em níveis de  $10^4$  NMP/g.

Estes valores se encontraram dentro da faixa de valores obtida por Vázquez et al. (1997), que foi de  $3,2 \times 10^3$  a  $1,1 \times 10^7$  NMP/g.

- **Cheiro-verde** – A metodologia dos tubos múltiplos apresentou maior contagem de coliformes totais,  $2,4 \times 10^5$  NMP/g, em relação ao sistema SimPlate, em níveis de  $10^3$ - $10^4$  NMP/g. O nível de contaminação do cheiro-verde para coliformes totais foi bastante elevado, considerando-se o fato da amostra analisada ser um produto irrigado com água de poço artesiano, de acordo com informações constantes nas embalagens comerciais, o que indica, provavelmente manipulação inadequada do produto durante o acondicionamento, transporte e comercialização.

- **Repolho** – A exemplo do que ocorreu com a maçã, o sistema SimPlate detectou  $10^2$  NMP/g de coliformes totais neste alimento, sendo que pelos tubos múltiplos tal detecção não ocorreu.

- **Cenoura** – As contagens de coliformes totais pelo SimPlate ( $10^4$  NMP/g) foram ligeiramente superiores as contagens encontradas pelos tubos múltiplos ( $10^3$ - $10^4$  NMP/g).

- **Beterraba** – As contagens de coliformes totais variaram em níveis de  $10^4$  NMP/g pelos tubos múltiplos e  $10^3$  NMP/g pelo SimPlate. Este alimento apresentou problemas nas leituras, pelo sistema SimPlate, onde nas menores diluições não foi possível determinar as contagens, uma vez que o grupo de pigmentos naturais da beterraba, as betacianinas são da mesma cor que o corante utilizado como indicador de crescimento de coliformes totais, o vermelho de clorofenol. Este fato deve, com certeza, ter levado a erros na estimativa de coliformes totais, pois as contagens tiveram que ser feitas em algumas poucas placas aleatoriamente escolhidas, onde nem foi possível se avaliar o efeito da diluição, o que é bastante crítico para a confiabilidade dos resultados. É, portanto, também um produto onde a análise de coliformes totais pelo SimPlate pode ser bastante comprometida.

- **Amendoim** – As contagens foram em níveis de  $10^1$  NMP/g pelos tubos múltiplos e em níveis de  $10^2$  NMP/g pelo SimPlate. Cerca de 10 minutos após a

inoculação, as cavidades das placas da diluição  $10^{-1}$  e algumas cavidades das placas da diluição  $10^{-2}$  (as que continham partículas do alimento) começaram a mudar de cor, do amarelo canário característico do meio para coliformes totais para uma coloração avermelhada, o que, sem dúvida, deve ter levado a uma superestimativa do número de coliformes totais, mostrando que esta metodologia não deve ser aplicada neste substrato.

Na análise para coliformes totais, o alimento que apresentou os maiores níveis de contaminação foi a alface, por ambas as metodologias.

Para coliformes totais a regra geral mencionada para PCA e BDA não se repetiu, ou seja, com maiores contagens pelas metodologias convencionais, tendo havido uma maior oscilação entre os resultados, onde em aproximadamente metade dos alimentos analisados que apresentaram contagens, as mesmas foram maiores pelo sistema SimPlate. Alguns fatos de falsos positivos foram discutidos para alguns alimentos analisados, onde foi possível visualizar rapidamente a mudança de coloração das cavidades até mesmo antes da incubação. Porém, tal fato pode também ter ocorrido para outros alimentos. Se tal fato não ocorreu para os demais alimentos, pode-se considerar o sistema SimPlate adequado para a enumeração de coliformes totais nestes alimentos, com recuperação maior das células ou UFC quando comparado com a metodologia convencional de tubos múltiplos.

#### **4.4 Contagem de coliformes fecais/*Escherichia coli***

##### **4.4.1 Análise microbiológica**

A Tabela 12 apresenta os valores obtidos nas análises para coliformes fecais (tubos múltiplos) e *Escherichia coli* (SimPlate).

Os dados de coliformes fecais/*E. coli* não foram submetidos à análise estatística, pois apenas dois alimentos (frango e alface) apresentaram contagens por ambos os métodos.

Tabela 12. Coliformes fecais/*Escherichia coli* em alimentos.

Alimento	CONTAGEM		Alimento	CONTAGEM	
	3 Tubos UFC/g ou ml	SimPlate NMP/g ou ml		3 Tubos UFC/g ou ml	SimPlate NMP/g ou ml
Carne Bovina	<0,3	<10	Maçã	0,3	<10
A1	<0,3	<10	A10	<0,3	<10
	<0,3	<10		<0,3	<10
Carne Suína	4,6x10	<10	Pera	<0,3	<10
A2	9,3	<10	A11	<0,3	<10
	9,3	<10		<0,3	<10
Frango	4,3	4,0x10 <sup>1</sup>	Tomate	<0,3	<10
A3	3,5	2,0x10 <sup>1</sup>	A12	<0,3	<10
	2,0	2,0x10 <sup>1</sup>		<0,3	<10
Lingüiça	<0,3	1,6x10 <sup>2</sup>	Alface	6,4	4,0x10 <sup>1</sup>
A4	<0,3	2,0x10 <sup>1</sup>	A13	2,3	4,0x10 <sup>1</sup>
	<0,3	2,0x10 <sup>1</sup>		4,3	4,0x10 <sup>1</sup>
Peixe	<0,3	4,0x10 <sup>1</sup>	Cheiro verde	<0,3	<10
A5	<0,3	2,0x10 <sup>1</sup>	A14	<0,3	<10
	<0,3	2,0x10 <sup>1</sup>		<0,3	<10
Fígado	<0,3	2,0x10 <sup>2</sup>	Repolho	<0,3	<10
A6	<0,3	2,0x10 <sup>2</sup>	A15	<0,3	<10
	<0,3	2,0x10 <sup>2</sup>		<0,3	<10
Leite cru	<0,3	3,8x10 <sup>2</sup>	Cenoura	2,4x10 <sup>2</sup>	<10
A7	<0,3	1,0x10 <sup>2</sup>	A16	2,4x10 <sup>2</sup>	<10
	<0,3	2,6x10 <sup>2</sup>		2,4x10 <sup>2</sup>	<10
Queijo	<0,3	<10	Beterraba	<0,3	<10
A8	<0,3	<10	A17	<0,3	<10
	<0,3	<10		<0,3	<10
Iogurte	<0,3	<10	Amendoim	<0,3	<10
A9	<0,3	<10	A18	<0,3	<10
	<0,3	<10		<0,3	<10

Convém salientar que a menção de contagem  $<0,3$  para a metodologia convencional dos tubos múltiplos significa que nenhum dos tubos inoculados se mostrou positivo, podendo ser encarado como ausência de coliformes fecais/g ou ml de produto.

No caso do sistema SimPlate, a menção de contagem  $<10/g$  ou ml, se refere a ausência de cavidades positivas, na menor diluição inoculada,  $10^{-1}$ .

A Resolução RDC nº 12 (ANVISA, 2001) determina  $5,0 \times 10^2$  NMP/g como contagem máxima de coliformes fecais para maçã e pera;  $10^2$  NMP/g para tomate, alface, cheiro-verde e repolho;  $10^3$  NMP/g para cenoura, beterraba e amendoim;  $10^4$  NMP/g para frango;  $5,0 \times 10^3$  NMP/g para lingüiça e queijo frescal; e 10 coliformes fecais/ml para iogurte.

Já o Código sanitário (São Paulo, 1992) estabelece padrões de  $10^2$  NMP de coliformes fecais/g para maçã e pera,  $2,0 \times 10^2$  NMP/g para tomate, alface, cheiro-verde, repolho, cenoura, beterraba e amendoim; padrão de  $3,0 \times 10^2$  NMP/g para carne bovina, carne suína, frango e fígado;  $10^2$  NMP/g para lingüiça, peixe e queijo frescal.

#### 4.4.1.1 Alimentos de origem animal

- **Carne bovina** – Não houve detecção de coliformes fecais ou de *E. coli* pelas metodologias correspondentes, portanto, as amostras analisadas estavam em acordo com os padrões legais vigentes para este grupo de bactérias.

Hoffmann et al. (1998) obtiveram valores que variaram desde ausência até  $3,9 \times 10^1$  NMP/g para carne bovina moída; já Tanaka et al. (1997) tiveram, em 61,6% das amostras de carne bovina, valores para coliformes fecais/*E. coli* que variaram desde ausência a até 10 NMP/g, 23,1% variaram de  $10^1$  a  $10^3$  NMP/g e 15,4% com valores acima de  $10^3$  NMP/g.

- **Carne suína** – Aqui a metodologia dos tubos múltiplos detectou crescimento de coliformes fecais com baixas contagens e não houve detecção de *E. coli* pelo sistema SimPlate, estando o produto analisado dentro dos padrões legais citados.



Os resultados da avaliação de carne suína feita por Hoffmann et al. (1998) variaram de ausência em três das quatro amostras analisadas e  $2,1 \times 10^2$  NMP/g. As amostras analisadas por Calderon & Furlanetto (1990) variaram de ausência a  $2,1 \times 10^4$  NMP/g. As maiores variações foram obtidas por Fuzihara & Franco (1993), cujas contagens foram de ausência a  $1,1 \times 10^6$  NMP/g.

- **Frango** – As contagens pelas duas metodologias não atingiram o limite máximo estabelecido, tanto pelo Código sanitário (São Paulo, 1992) ( $3,0 \times 10^2$  NMP/g) quanto pela Resolução RDC nº 12 (ANVISA, 2001) ( $10^4$  NMP/g), mas o sistema SimPlate apresentou contagens maiores do que as obtidas pelos tubos múltiplos.

Vieira & Teixeira (1997) observaram em carcaças resfriadas de frango desde ausência de coliformes fecais até valores iguais a  $1,1 \times 10^3$  NMP/g, enquanto que Hoffmann et al. (1995) encontraram valores de  $9,0$  a  $9,3 \times 10^1$  NMP/g.

- **Fígado bovino** – Pelo método de tubos múltiplos não ocorreu detecção de coliformes fecais, o que coloca as amostras analisadas excelentes condições higiênicas; já pelo sistema SimPlate a detecção foi de  $2,0 \times 10^2$  NMP/g, bastante próxima do limite máximo estabelecido pelo Código sanitário (São Paulo, 1992), que é de  $3,0 \times 10^2$  NMP/g.

Tanaka et al. (1997) analisaram três amostras de fígado e encontraram uma delas com resultado para coliformes fecais/*E. coli* acima de  $10^3$  NMP/g.

- **Lingüiça** – Pela metodologia dos tubos múltiplos não houve detecção de coliformes fecais; já no sistema SimPlate houve detecção de *E. coli* ( $10^1$ - $10^2$  NMP/g) e uma das leituras foi de  $1,6 \times 10^2$  NMP/g, estando acima do limite máximo estabelecido pelo Código sanitário (São Paulo, 1992), deixando o produto analisado sob suspeita de más condições higiênicas. Em relação aos padrões mencionados na Resolução RDC nº 12 (ANVISA, 2001), as leituras estiveram abaixo dos referidos padrões.

Vasconcelos & Iaria (1991) encontraram desde ausência até  $4,3 \times 10^4$  NMP/g e Tanaka et al. (1997) relataram a presença de coliformes fecais/*E. coli* acima de  $10^3$  NMP/g em duas de três amostras de lingüiça suína por eles analisadas.

- **Peixe** – Aqui, pelos tubos múltiplos as amostras se mostraram isentas de coliformes fecais, enquanto que pelo sistema SimPlate foi detectada a presença de *E. coli*, com contagens na ordem de  $10^1$  NMP/g, o que coloca o produto de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos para coliformes fecais, que é de  $10^2$  NMP/g, pelo Código sanitário (São Paulo, 1992).

Himelbloom & Pfitzenreuter (1998) observaram que filés de salmão rosa produziram fluorescência quando incubados em meio contendo MUG, sem a presença de bactérias produtoras de  $\beta$ -glicuronidase. Portanto, é necessária a verificação de quais tipos de peixes são capazes de manifestar esse fenômeno a fim de evitar a ocorrência de resultados falso-positivos.

- **Leite cru** – A metodologia convencional não detectou coliformes de origem fecal nas amostras analisadas; já no sistema SimPlate houve detecção de *E. coli* em níveis de  $10^2$  NMP/ml. Mesmo não se tendo padrões para o leite cru pode-se considerar o produto, pela metodologia convencional, em excelentes condições microbiológicas, uma vez que estaria apresentando níveis compatíveis com leite pasteurizado tipo A.

No entanto, se o sistema SimPlate tiver conseguido a recuperação de coliformes fecais injuriados e que não cresceram nos tubos múltiplos (pouco provável a hipótese), aí ter-se-ia uma grande vantagem do sistema SimPlate, que estaria mostrando a má qualidade higiênica do produto e a necessidade de pasteurização, para adequar o produto ao consumo humano.

- **Queijo e Iogurte** – Aqui não houve detecção de coliformes fecais/*E. coli* pelas duas metodologias empregadas. As amostras analisadas mostraram-se em ótimas condições sob o ponto de vista higiênico, enquadrando-se perfeitamente nos padrões microbiológicos citados.

Para o queijo, Garcia-Cruz et al. (1994) obtiveram para queijo frescal microtexturizado ausência de coliformes fecais e para dois queijos tipo frescal industriais, contagens de  $4,3 \times 10^1$  e  $4,6 \times 10^2$  NMP/g. Já os valores de Nascimento et al. (1985) variaram bastante, de ausência a  $1,1 \times 10^8$  NMP/g.

Para o iogurte, Hoffmann et al. (1997) observaram ausência de coliformes fecais em iogurte natural.

#### 4.4.1.2 Alimentos de origem vegetal

- **Maçã e Pera** – Não houve detecção de coliformes de origem fecal para essas amostras nos tubos múltiplos ou de *E. coli* pelo SimPlate estando ambos, portanto, dentro do limite máximo estabelecido pelos padrões citados.

- **Tomate** – As amostras analisadas se enquadraram nos padrões legais vigentes estabelecidos, uma vez que não houve detecção de coliformes fecais/*E. coli* por ambas as metodologias.

- **Alface** – Houve detecção de coliformes fecais/*E. coli* pelas duas metodologias, com o sistema SimPlate apresentando contagens maiores. Mesmo assim as contagens estiveram abaixo do limite estabelecido como padrão tanto pela legislação federal como pela estadual, que é de  $10^2$  NMP/g e  $2,0 \times 10^2$  NMP/g, respectivamente.

Vázquez et al. (1997), em análise de alface, encontraram valores que variaram desde ausência até o valor máximo de  $9,3 \times 10^3$  NMP/g para coliformes fecais.

- **Cheiro-verde e Repolho** – Não houve detecção de coliformes fecais/*E. coli* pelas duas metodologias empregadas, o que coloca os produtos em excelentes condições, segundo os padrões microbiológicos estabelecidos. Aqui é de se estranhar o fato da não detecção de coliformes fecais, a menos que os produtos tenham sido obtidos através de irrigação com água de excelente qualidade microbiológica, bem lavados após a colheita e manipulados adequadamente nas etapas de acondicionamento, transporte e comercialização.

- **Cenoura** – As contagens de coliformes fecais em cenoura variaram bastante entre as metodologias, uma vez que não houve detecção pelo sistema SimPlate e no

sistema de tubos múltiplos houve detecção, estando as três leituras, com  $2,4 \times 10^2$  NMP/g, acima do limite máximo recomendado pelo Código sanitário (São Paulo, 1992), de  $2,0 \times 10^2$  NMP/g, mas abaixo do padrão da Resolução RDC nº 12 (ANVISA, 2001), que é de  $10^3$  NMP/g.

Tal resultado reforça bastante a orientação de necessidade de boa lavagem/desinfecção de produtos vegetais que tem contato direto com o solo, que recebem adubação orgânica sem controle e/ou que sejam irrigados com água de má qualidade microbiológica. Há que se considerar também a possibilidade de veiculação de bactérias de origem fecal aos alimentos através de manipulação, transporte e comercialização em condições higiênicas inadequadas.

- **Beterraba** – As amostras analisadas se enquadraram nos padrões legais vigentes, uma vez que por ambas as metodologias não houve detecção de coliformes fecais.

- **Amendoim** – As amostras analisadas não apresentaram crescimento de coliformes fecais por ambas as metodologias, atendendo, portanto, tanto as especificações do Código sanitário (São Paulo, 1992), como da Resolução RDC nº 12 (ANVISA, 2001).

Na contagem de coliformes fecais pelos tubos múltiplos, a cenoura foi considerada produto em condições higiênicas insatisfatórias. A lingüiça, pelo sistema SimPlate, apresentou uma das leituras acima do limite máximo estabelecido. Os demais alimentos analisados se enquadraram nos padrões microbiológicos estabelecidos tanto pela Resolução RDC nº 12 (ANVISA, 2001) como pelo Código sanitário (São Paulo, 1992).

Dos dezoito alimentos analisados, apenas oito (44,4%) apresentaram crescimento de coliformes fecais/*E. coli*. Desses oito, seis apresentaram contagens maiores pelo SimPlate, o que pode estar relacionado a uma maior recuperação de células injuriadas, quando comparado com a metodologia convencional de tubos múltiplos. Resta estudar

melhor se algum dos alimentos nesta situação não seria como alguns já citados na literatura e que dão resultados falso-positivos.

No caso dos resultados encontrados para cenoura e carne suína, onde houve detecção de coliformes fecais pela técnica dos tubos múltiplos e não detecção de *E. coli* pelo sistema SimPlate, a explicação para o fato pode ser dada em função de ser outro coliforme fecal (*Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp) que não a *E. coli* presente nas amostras, uma vez que o sistema SimPlate é específico para a *E. coli*.

Já nos resultados obtidos para as amostras de leite cru e fígado bovino analisadas, onde fato inverso ocorreu, ou seja, detecção de *E. coli* pelo SimPlate e não detecção de coliformes fecais pela metodologia convencional de tubos múltiplos, fica difícil a explicação, a menos que os coliformes fecais tenham tido dificuldade de se recuperarem durante o período de 48 h no teste presuntivo, o que é bastante improvável. Haveria ainda outra hipótese que seria o crescimento de alguma bactéria MUG(+), dando fluorescência, uma vez que há relato na literatura de cepas de *Shigella* com esta característica (Berger, 1994). Resta saber se seriam capazes de crescer neste substrato definido que, segundo o fabricante, é inibidor de outras bactérias e específico para *E. coli*.

## 5 CONCLUSÕES

1. As metodologias convencionais para contagem total de mesófilos e contagem de bolores e leveduras, de maneira geral, foram mais eficientes na recuperação de células ou UFC microbianas em relação ao SimPlate. Já para a detecção de coliformes fecais/*E. coli*, o sistema SimPlate se comportou melhor, com maior recuperação de células ou UFC.

2. Entre os alimentos não indicados para serem avaliados pelo sistema SimPlate, o fígado não correspondeu ao mencionado na literatura, onde há relatos de falsos positivos pela fluorescência ocorrida em função de enzimas do próprio alimento e não dos microrganismos. As contagens microbianas observadas no sistema SimPlate foram menores do que as obtidas pela metodologia convencional, nas análises para contagem microbiana total, bolores e leveduras e coliformes totais, somente tendo sido possível a ocorrência de falsos positivos nas contagens de coliformes fecais/*E. coli*, onde aqui sim elas foram maiores quando se utilizou o sistema SimPlate.

3. A beterraba, juntamente com o amendoim foram os alimentos que apresentaram problemas nas análises pelo SimPlate. A beterraba devido à presença do grupo de pigmentos, as betacianinas, e o amendoim por causar alteração na coloração do meio antes mesmo da incubação das placas. No caso do amendoim, este foi o único alimento que apresentou contagens superiores pelo SimPlate para os três grupos microbianos, mesófilos aeróbios, bolores e leveduras e coliformes totais.

4. Pela análise da variância, para a contagem de mesófilos aeróbios as duas metodologias empregadas tiveram o mesmo comportamento, ou seja, não diferiram estatisticamente entre si, em dois dos quinze alimentos considerados na análise. Na contagem de bolores e leveduras o comportamento foi o mesmo em quatro dos treze alimentos considerados e para coliformes totais em seis dos doze alimentos considerados.

5. Pela análise de regressão, comparando-se o sistema SimPlate com as metodologias convencionais, a melhor correlação foi obtida entre os dados considerados do SimPlate com os Tubos Múltiplos, 0,88. O dados do SimPlate com o PCA teve um fator de 0,80 e os dados do SimPlate com o BDA 0,68, a menor correlação.

6. Com os resultados obtidos nas condições deste trabalho, o sistema SimPlate não se mostrou uma alternativa viável, em relação a metodologias convencionais, para a maioria dos alimentos, considerando-se os resultados da análise da variância. Entretanto ao se considerar as análises de regressão, foram obtidos bons fatores de correlação entre os resultados, para contagem total de mesófilos e contagem de coliformes totais. Para alguns alimentos os resultados foram correlatos, mas para outros não. Este parece ser um sistema que sofre interferência de diversos agentes, portanto seria necessária a realização de análises individuais para cada alimento em cada grupo microbiano. No entanto, deve-se considerar que se trata, de fato, de um sistema muito prático e rápido, devendo, por isso, ser considerado num processo de escolha de um método para análise microbiológica de alimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.** [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm) (02 mar. 2002).

ANTUNES, L.A.F.; OLIVEIRA, J.S. Qualidade microbiológica de leite cru. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.41, n.244, p.20-24, 1986.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Bactérias coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em alimentos:** determinação do número mais provável (NMP): MB-3463. Rio de Janeiro: ABNT, 1991. 7p.

BANWART, G.J. **Basic food microbiology.** 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 773p.

BARROS, V.R.M.; PANETTA, J.C.; PERCES, M.C. Eficiência do sistema de pasteurização utilizado em usinas de beneficiamento de leite na capital de São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v.3, n.3/4, p.199-207, set./dez. 1984.

BELOTI, V. Fatores que podem influenciar o desempenho de métodos rápidos para enumeração de microrganismos indicadores de higiene em leite pasteurizado. São Paulo, 2000. 87p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.



- BERGER, S.A. Increased protection afforded by the defined substrate technology Colilert system by its ability to detect *Shigella*  $\beta$ -glucuronidase. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, n.1, p.53-56, July 1994.
- BEUCHAT, L.R.; COPELAND, F.; CURIALE, M.S. et al. Comparison of the SimPlate Total Plate Count method with Petrifilm, Redigel, and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.1, p.14-18, 1998.
- BRACKETT, R.E.; SPLITTSTOESSER, D.F. Fruits and vegetables. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. chap.49, p.919-927.
- CALDERON, D.F.; FURLANETTO, S.M.P. Análise bacteriológica de carnes suínas comercializadas em açougues da cidade de São Paulo. **Revista de Microbiologia**, v.21, n.4, p.331-336, out./dez. 1990.
- CAMPREGHER, R.B. Utilização das metodologias convencional e SimPlate para avaliação das condições microbiológicas de suco de laranja pasteurizado e não pasteurizado. Piracicaba, 2000. 97p. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- COSTA, L.C.G.; CARVALHO, E.P.; CARVALHO, A.S. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio da ordenha manual e mecânica, na fonte de produção. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.39, n.235, p.3-6, set./out. 1984.

- FENG, P. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1995. 1v.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Gaithersburg: AOAC, 1995. v.1.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- FUZHARA, T.O.; FRANCO, B.D.G.M. Bactérias patogênicas e bactérias indicadoras de higiene em carne suína comercializada em Santo André-São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.13, n.1, p.77-88, jan./jun. 1993.
- GARCIA-CRUZ, C.H.; HOFFMANN, F.L.; VINTURIM, T.M. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas-frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.54, n.2, p.78-82, jun./dez. 1994.
- GOMES, M.F.F.F.; FURLANETTO, S.M.P. Grupos de bactérias isoladas a partir de amostras de fígado de bovino. **Revista de Microbiologia**, v.18, n.4, p.335-343, out./dez. 1987.
- HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998. 66p.
- HAJDENWURCEL, J.R.; SOUZA, H.M. Avaliação do método SimPlate para contagem de coliformes totais e *E.coli* em leite fluido. **Indústria de Laticínios**, v.3, n.18, p.71-77, set./out. 1998.

- HAYES, P.R. **Food microbiology and hygiene**. 2.ed. New York: Chapman and Hall, 1995. 516p.
- HIMELBLOOM, B.H.; PFUTZENREUTER, R.C. False-positive fluorescence by pink salmon tissue and staphylococci in a rapid test for *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v.61, n.9, p.1119-1123, 1998.
- HITCHINS, A.D.; HARTMAN, P.A.; TODD, E.C.D. Coliforms: *Escherichia coli* and its toxins. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. chap.24, p.325-369.
- HOFFMANN, F.L.; GRACIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M. Estudo higiênico-sanitário de frangos comercializados na cidade de São José do Rio Preto-SP. **Higiene Alimentar**, v.9, n.35, p.31-33, jan./fev. 1995.
- HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M. Qualidade microbiológica de amostras de carnes e de presunto. **Higiene Alimentar**, v.12, n.58, p.52-57, nov./dez. 1998.
- HOFFMANN, F.L.; PAGNOCCA, F.C.; FAZIO, M.L.S.; VINTURIM, T.M. Estudo higiênico-sanitário de diferentes tipos de iogurte. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.15, n.2, p.187-196, jul./dez. 1997.
- IDEXX LABORATORIES. **Introducing SimPlate for total coliform and *E. coli***. 1996. 1v.
- IDEXX LABORATORIES. **SimPlate quantifies yeast and mold in 48 hours**. s.n.t.

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

JAY, J.M. **Modern food microbiology.** 5.ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1998. 661p.

MOREIRA, S.R. Caracterização microbiológica de iogurtes comercializados em Lavras – MG. Lavras, 1998. 72p. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal de Lavras.

MURATORI, M.C.S.; OLIVEIRA, A.L.; RIBEIRO, L.P. et al. Comparación entre el método estándar sugerido por APHA y los métodos SimPlate y Petrifilm, para la identificación del grupo coliforme y de *Escherichia coli* em tilapia (*Oreochromis sp*) procedente de piscicultura de agua dulce. **Revista Argentina de Microbiología**, v.32, n.1, p.15-19, 2000.

NASCIMENTO, D.; SABIONI, J.G.; PIMENTA, N.; XANDÓ, S.R. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas–frescal da cidade de Ouro Preto-MG. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.120-129, abr./jun. 1985.

PEELER, J.T.; HOUGHTBY, G.A.; RAINOSEK, A.P. The most probable number technique. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. chap.6, p.105-120.

PELCZAR JR, M.J; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia:** conceitos e aplicações. 2.ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1997. v.2. cap.30, p.372-397: Microbiologia de Alimentos.

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

RICHTER, R.L.; LEDFORD, R.A.; MURPHY, S.C. Milk and milk products. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. chap.45, p.837-856.

RISER, E.C.; GRABOWSKI, J.; GLENN, E.P. Microbiology of hydroponically-grown lettuce. **Journal of Food Protection**, v.47, n.10, p.756-769, Oct. 1984.

ROSSI JR., O.D.; IARIA, S.T.; SANTOS, I.F.; BERCHIERI JR., A. Carne mecanicamente separada de origem bovina: I – Influência de dois sistemas de desossa manual sobre as características microbiológicas do produto recém obtido. **Revista de Microbiologia**, v.21, n.4, p.324-330, 1990.

SABIONI, J.G.; MAIA, A.R.P.; LEAL, J.A. Avaliação microbiológica de lingüiça frescal comercializada na cidade de Ouro Preto – MG. **Higiene Alimentar**, v.13, n.61, p.110-113, abr./maio 1999.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Saúde. **Código sanitário**: Decreto nº 12.342 de 27 de setembro de 1978: regulamento da promoção e recuperação da saúde no campo da competência da Secretaria de Estado da Saúde (revisto e atualizado até dezembro de 1990). 5.ed. São Paulo: IMESP, 1992. 412p.

SILVA, N. Novos métodos de análise microbiológica de alimentos. **Coletânea do ITAL**, v.25, n.1, p.1-13, jan-jun. 1996.

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

- SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995. 159p.
- SMITH, C.F.; TOWNSEND, D.E. A new medium for determining the total plate count in food. **Journal of Food Protection**, v.62, n.12, p.1404-1410, 1999.
- SPANGENBERG, D.S.; INGHAM, S.C. Comparison of methods for enumeration of yeasts and molds in shredded low-moisture, part-skim mozzarella cheese. **Journal of Food Protection**, v.63, n.4, p.529-533, 2000.
- SPLITTSTOESSER, D.F. Predominant microorganisms on raw plant foods. **Journal of Milk and Food Technology**, v.33, n.11, p.500-505, Nov. 1970.
- SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. chap.4, p.75-95.
- TANAKA, A.Y.; GOMES, S.M.M.; MATHEUS, D.P.; LEITE, C.Q.F. Avaliação bacteriológica de carnes e seus derivados comercializados na cidade de Bauru-SP. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.15, n.1, p.15-24, jan./jun. 1997.
- TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. da; BANHE, A.A.; IAMANAKA, B.T.; SILVA, N. Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. **Journal of Food Protection**, v.64, n.10, p.1592-1596, 2001.

- TOWNSEND, D.E.; IRVING, R.L.; NAQUI, A. Comparison of the SimPlate coliform and *Escherichia coli* test with Petrifilm, three-tube MPN, and VRBA+MUG methods for enumerating coliforms and *E. coli* in food. **Journal of Food Protection**, v.61, n.4, p.444-449, 1998.
- TOWNSEND, D.E.; NAQUI, A. Comparison of SimPlate total plate count with plate count agar method for detection and quantitation of bacteria in food. **Journal of AOAC International**, v.81, n.3, p.563-569, 1998.
- VASCONCELOS, J.C.; IARIA, S.T. Condições microbiológicas (higiênico-sanitárias) das lingüiças frescas comercializadas em feiras livres no município de São Paulo-SP. I. Indicações de contaminação. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.9, n.1, p.64-75, jan./jun. 1991.
- VAUGHN, R.H. The microbiology of dehydrated vegetables. **Food Research**, v.16, p.317-327, Jan./Dec. 1951.
- VÁZQUEZ, F.M.; MARTOS, M.A.; DUCE, J.A. et al. Estúdio microbiológico de lechugas frescas. **La Alimentación Latinoamericana**, n.220, p.41-47, 1997.
- VIEIRA, C.R.N.; TEIXEIRA, C.G. Condições higiênico-sanitárias de carcaças resfriadas de frango comercializadas em Poços de Caldas – MG. **Higiene Alimentar**, v.11, n.48, p.36-40, mar./abr. 1997.
- VIEIRA, K.V.M.; MAIA, D.C.C.; JANEIRO, D.I. et al. Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em filés congelados. **Higiene Alimentar**, v.14, n.74, p.37-40, jul. 2000.