



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 3.607, de 17/10/05, D.O.U. nº 202, de 20/10/2005

ASSOCIAÇÃO EDUCACIONAL LUTERANA DO BRASIL

MARILIA ESTEVES DOS SANTOS

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE SUCO NATURAL DE LARANJA
COMERCIALIZADO EM RESTAURANTES DA REGIÃO SUL DO MUNICÍPIO DE
PALMAS - TO**

Palmas – TO

2016

MARILIA ESTEVES DOS SANTOS

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE SUCO NATURAL DE LARANJA
COMERCIALIZADO EM RESTAURANTES DA REGIÃO SUL DO MUNICÍPIO DE
PALMAS - TO**

Monografia elaborada como requisito parcial da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) em Ciências Farmacêuticas do curso de Farmácia, coordenado pela Prof.^a. MSc. Grace Priscila Pelissari Setti, no Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Dayane Otero Rodrigues.

Palmas – TO

2016

MARILIA ESTEVES DOS SANTOS

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE SUCO NATURAL DE LARANJA
COMERCIALIZADO EM RESTAURANTES DA REGIÃO SUL DO MUNICÍPIO DE
PALMAS - TO**

Monografia apresentada como requisito parcial da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) em Ciências Farmacêuticas do curso de Farmácia, coordenado pela Prof.^a MSc. Grace Priscila Pelissari Setti, no Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Aprovado em: ____/____/2016.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Dayane Otero Rodrigues
Centro Universitário Luterano de Palmas

Prof.^o MSc. Luís Fernando Albarello Gellen
Centro Universitário Luterano de Palmas

Prof.^a MSc. Marta C. de Menezes Pavlak
Centro Universitário Luterano de Palmas

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha linda família que teve paciência comigo durante esses anos de faculdade e aos meus amigos por estar comigo nos momentos mais difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus primeiramente, por estar sempre presente e ter me dado forças ao longo do caminho, agradeço à minha mãe Mirian Esteves, ao meu pai Sandoval Jose Filho e a minha irmã Ana Elisa Esteves dos Santos pelo carinho, compreensão e apoio incondicionais dados a mim durante toda a vida, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dr.^a Dayane Otero Rodrigues pela orientação, dedicação, paciência e incentivo que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço também as minhas amigas da faculdade, Ananda Santos Araujo, Helem Maria Cicotti, Angélica Pasini, Sara Valério da Silva pela companhia, ajuda e amizade. Agradeço também a Maria de Assis Alexandre, técnica do complexo laboratorial que me ajudou sempre que eu precisava com o maior carinho e paciência obrigada por tudo.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim e pela construção deste trabalho.

RESUMO

SANTOS, Marília Esteves. **Análise microbiológica de amostras de suco natural de laranja comercializado em restaurantes da Região Sul do Município de Palmas - TO.** 2016. 27p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Farmácia, Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas/TO, 2016.

O suco de laranja é uma importante fonte de vitamina C, vitamina A, β -caroteno, folato e tiamina, e apresenta um pH na faixa de 2,0 a 4,5. Esta característica pode contribuir para o crescimento de microrganismos, inclusive microrganismos patogênicos ao homem. Em vista disso, este trabalho teve como principal objetivo realizar uma análise microbiológica de amostras de suco natural de laranja de oito restaurantes da região sul do município de Palmas - TO. Para esta análise foi utilizado o método de Número Mais Provável (NMP) para estimar a contaminação por Coliformes totais e termotolerantes. O método de contagem direta em placa foi usado para analisar a presença de *Staphylococcus* spp. e a *Salmonella*. Os resultados obtidos foram comparados com a legislação vigente afim de analisar se as amostras estão dentro do permitido, já que o alimento contaminado pode trazer graves problemas de saúde ao consumidor. Das oito amostras analisadas para coliformes termotolerante, 7 (87,5%) tiveram resultados acima do permitido da legislação. Já no que tange à análise de *Staphylococcus* nenhuma amostra positivou, entretanto para *Salmonella* sp. todas apresentaram resultados positivos então todas as amostras estão impróprias para o consumo segundo a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Anvisa. Os resultados indicam que não há garantia da qualidade higiênica na produção do suco natural de laranja, oferecendo risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Contaminação. Coliformes. Riscos à saúde.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padronização microbiológica usada para avaliação de suco natural de laranja.....21

Tabela 2 - Número Mais Provável encontrados nas amostras para Coliformes totais e termotolerantes da análise microbiológica de 8 amostras de suco natural de laranja comercializado em restaurantes da região sul do município de Palmas – TO.....22

Tabela 3 - Resultados encontrados para *Salmonella* sp. de 8 amostras de suco natural de laranja comercializados na região sul de Palmas – TO.....23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEULP	Centro Universitário Luterano de Palmas
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EC	<i>E. coli</i>
LST	Lauril Sulfato Triptose
NMP	Numero Mais Provável
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
VB	Verde Brilhante Bile
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por millitros

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	10
2. Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 Características da laranja	13
3.2 Contaminação Microbiológica do Suco de Laranja.....	13
3.3 Fontes de contaminação do suco natural de laranja.....	14
3.4 Bactérias de Importância na análise microbiológica alimentar.....	15
3.4.1 Coliformes Totais e Termotolerantes	15
3.4.2 Staphylococcus aureus.....	16
3.4.3 Salmonella.....	16
3.5 Legislação em relação à análise alimentar.....	17
4 METODOLOGIA.....	19
4.1 Obtenção das Amostras.....	19
4.2 Preparo das Amostras.....	19
4.3 Análise Microbiológica.....	19
4.3.1 Coliformes Totais e Termotolerantes.....	19
4.3.1.1 Teste Presuntivo.....	20
4.3.1.2 Teste Confirmatório.....	20
4.3.2 Salmonella.....	20
4.3.3 Staphylococcus spp.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6 CONCLUSÃO.....	25
Referências.....	26

1 INTRODUÇÃO

A laranja é um fruto de importância para a agricultura e a economia brasileira, sendo que o Brasil é responsável pela maioria das laranjas produzidas na América do Sul (MATTOS JÚNIOR et al., 2005; DELLA TORRE et al., 2003).

Dentre os produtos derivado da laranja, destaca-se o suco, que é feito de frutas maduras da espécie *Citrus sinensis*, sendo dentre os subprodutos, o mais popular entre os brasileiros, com uma grande aceitabilidade (MATTOS JÚNIOR et al., 2005)

O suco oferece um ambiente inóspito e seletivo para um grande número de patógenos, por apresentar seu pH na faixa de 2,0 a 4,5, mas mesmo assim, o seu consumo tem sido associado à casos de doença, pois em todo seu processo de manipulação, o produto é exposto a agentes contaminantes (OLIVEIRA et al, 2006).

A importância da análise microbiológica, sendo considerada como qualitativa ou quantitativa de microrganismos, como, por exemplo, coliformes totais e termotolerantes está relacionados à contaminação intestinal. A quantidade de microrganismos poderá aumentar, conforme os fatores relacionados à conservação da fruta, podendo levar doenças transmitidas por alimentos ao consumidor (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; SILVA et al., 2010).

As doenças transmitidas por alimentos são comuns na população, por isso vem despertando o interesse em estudar esses indicadores. Dentre os microrganismos analisados em alimentos, os coliformes totais, termotolerantes e *Salmonella* são os cobrados pela legislação RDC 12/2001 para suco natural (BRASIL, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 1998).

O controle microbiológico seguido das Boas Práticas de Manipulação é indispensável para garantir a qualidade do produto final, estabelecendo os critérios da RDC 12/2001, que preconiza uma tolerância para a possibilidade da presença de microrganismos em suco natural, assegurando a saúde do consumidor (BRASIL, 2001).

O suco natural de laranja tem alto consumo pelo seu sabor agradável e por ser uma fonte de vitamina C, minerais e carboidratos. Com isso, o consumo do suco é muito grande em vias públicas como restaurantes, bares e lanchonetes. A produção do suco de laranja é feita por um manipulador e com auxílio de máquinas, o que pode levar a uma contaminação do suco, pois existe a possibilidade do manipulador não realizar uma higienização adequada das máquinas e das mãos e até mesmo das frutas utilizadas na produção do suco, o que pode desencadear uma possível contaminação microbiológica do produto, então é fundamental o monitoramento

microbiológico. Sendo assim, é importante avaliar o desenvolvimento de microrganismos presentes nos sucos naturais de laranja comercializados em Palmas – TO.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Analisar as bactérias presentes nas amostras do suco natural de laranja comercializado em restaurantes da região Sul de Palmas - TO.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar coliformes totais, termotolerantes e *Staphylococcus* spp nas amostras de suco natural de laranja.
- Identificar colônias de *Salmonella* spp nas amostra de suco.
- Comparar os resultados obtidos das amostras dos sucos com a legislação vigente.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Característica da Laranja

A laranja é um fruto produzido pela laranjeira (*Citrus sinensis*), uma árvore que pertence à família *Rutaceae*, gênero *Citrus*, espécie *sinensis*. É um fruto híbrido, criado a partir do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) com a tangerina (*Citrus reticulata*) (MATTOS JÚNIOR et al., 2005; SILVA et al., 2005).

A laranjeira tem origem asiática, sendo uma árvore de porte médio, podendo atingir até 4 metros de altura, sua copa é bastante densa e tem um formato arredondado. Os frutos possuem um formato e coloração variável de acordo com as variedades de laranjas, sendo que o período de frutificação é de abril a setembro (MATTOS JÚNIOR et al., 2005; MEDEIROS et al., 2013)

Os frutos são fontes de β -caroteno, folato, tiamina e potássio, possuem um baixo teor calórico, além de ser uma excelente fonte de vitamina C, vitaminas A, com isso o suco de laranja apresenta alto consumo e boa aceitação pela população (APTEKMAN et al., 2010; MEDEIROS et al., 2013).

O suco de laranja pode ser produzido artesanalmente ou industrialmente. A produção do suco de laranja natural é, geralmente, feita manualmente, com auxílio de máquinas e utensílios que podem apresentar falhas quanto à higienização inadequada. Nesse processo, o suco de laranja não é submetido à pasteurização e a nenhum tipo de conservante e corante, fazendo com que sua vida útil seja menor (MEDEIROS et al., 2013; SOARES et al., 2011)

Em grande parte, o suco é comercializado em vias públicas, com armazenamento inadequado como guarda fora da geladeira por um tempo maior, podendo ser adquirido pelo consumidor com alguma alteração física, química ou microbiológica (BRITO; ROSSI, 2005; MALLON; BORTOLZO, 2005).

3.2 Contaminação Microbiológica do Suco de Laranja

Conforme Tortora, Case e Funke (2012), os microrganismos são uma forma de vida que podem ser encontrados no ar, na água, no solo e inclusive nos animais e plantas, que só podem ser visualizados com auxílio de um microscópio, podendo ser classificados como parasitas e não parasitas (BROOKS et al., 2014).

Os parasitas necessitam de um hospedeiro para sua sobrevivência, podendo causar danos a este. Porém os microrganismos podem ser utilizados de forma benéfica, como na fabricação de alimentos e no auxílio de atividade funcionais do dia

a dia, neste caso, são classificados como microrganismos nutritivos, quando promovem danos à saúde, são chamados de microrganismos patogênicos (BROOKS et al., 2014).

A multiplicação de microrganismos nos alimentos é diretamente relacionada às condições do substrato em que se encontram, dependendo do tipo de alimento e de fatores que predisõem à esse desenvolvimento. Os fatores que influenciam a multiplicação dos microrganismos são classificados como fatores intrínsecos, tais como atividade da água, pH e conteúdo dos nutrientes e fatores extrínsecos, que são aqueles relacionados ao ambiente que cerca o alimento, como umidade relativa, temperatura e armazenamento (BARBOSA; TORRES; FURLANETO, 2010)

Para a conservação dos alimentos, em geral controla-se os fatores intrínsecos e extrínsecos para que haja um desfavorecimento de crescimento do microrganismo. Por isso a importância em realizar o controle de qualidade microbiológica, pois algumas bactérias presentes nos alimentos podem causar doenças ao indivíduo que as consome (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

A manipulação inadequada do fruto de laranja poderá vir a contaminar o suco, que uma vez contaminado e com condições favoráveis à multiplicação, podem mudar características físicas e químicas do produto, podendo levá-lo a deterioração, provocando intoxicações e infecções alimentares. Sendo que uma das formas de contaminação do suco é pelas bactérias presentes nas mãos dos manipuladores, onde infere-se a importância de utilização de luvas no manuseio com os alimentos e da correta higienização das mãos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

3.3 Fontes de contaminação do suco natural de laranja

Segundo Soares e colaboradores (2011), uma das fontes principais de agentes patogênicos é o trato gastrointestinal dos animais e do ser humano. As mãos dos manipuladores podem estar contaminadas por microrganismos entéricos e os alimentos preparados poderão ser contaminados também quando as condições higiênico-sanitárias não forem apropriadas. (ARRUDA et al., 2009)

Outro fator importante de risco é decorrente desde a produção do fruto até a higienização inadequada dos equipamentos e utensílios como faca, tábuas, processadores, espremedores, que podem favorecer contaminações cruzadas, cuja fonte pode ser o ar, a poeira, a matéria-prima e o próprio manipulador (SOARES et al, 2011).

3.4 Bactérias de Importância na análise microbiológica de alimentos

No suco, pode-se encontrar diversos microrganismos dentre eles, bactérias e fungos. As principais bactérias encontradas são: *Staphylococcus* sp; *Salmonella* sp. e coliformes totais e termotolerantes (BRITO; ROSSI, 2005)

O grupo dos coliformes é um dos melhores indicadores relacionados com o nível de higiene dos alimentos (SILVA, 2010).

De acordo com Brito e Rossi (2005), as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) causam alguns distúrbios gastrointestinais, isso pode vir a ocorrer por presença de microrganismo patogênico, higiene dos manipuladores com os utensílios e frutas a ser utilizadas. Com isso tem que ter um bom controle higiênico sanitário do ambiente (WELKER et al., 2010; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

3.4.1 Coliformes Totais e Termotolerantes

Os coliformes pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e tem como habitat natural o trato gastrointestinal humano e alguns ambientes como o solo e água, por isso são designados como coliformes totais (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; SILVA et al., 2010).

A presença dos coliformes totais pode ser uma indicação de falhas no controle de qualidade higiênico-sanitários de água e alimentos, mas a presença desses microrganismos em quantidades pequenas não quer dizer necessariamente que o alimento esteja contaminado, sendo assim necessário avaliar e comparar com a legislação (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; SILVA et al., 2010; CUNHA; SILVA, 2006).

A *Escherichia coli* é adaptada à temperatura do intestino se desenvolvendo até 45°C, portanto é um coliforme termotolerante, caracteriza a contaminação do alimento como de origem fecal, capaz de degradar a lactose presente no alimento de ataque, o que favorece a sua proliferação em alimentos contendo esse substrato (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; PLAYFAIR et al., 1999).

Os coliformes são um dos causadores das infecções alimentares, conhecidas como toxicoinfecções, que são doenças transmitidas através da ingestão de patógenos em alimentos contaminados, que se desenvolvem e produzem toxinas capazes de causarem doenças no trato intestinal e até mesmo em outras áreas do corpo (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008, CUNHA; SILVA, 2006).

3.4.2 *Staphylococcus* spp

Dentre o gênero *Staphylococcus* spp, a espécie *Staphylococcus aureus* é uma das espécies de maior importância para microbiologia de alimentos, pois é um dos maiores causadores de intoxicações no nosso meio, devido as suas enterotoxinas produzidas no alimento e o fato de serem termoestáveis, ou seja, não são destruídas pelo calor empregado durante o processo de produção do alimento (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; GERMANO; GERMANO, 2011; CARVALHO, 2010).

S. aureus e *S. epidermidis* habitam comumente a pele humana e mucosas, o que predispõe à contaminação do suco durante a sua manipulação, já que as mãos sem luvas tem contato direto no preparo do suco. Além disso, as falhas na higiene pessoal durante o processo de fabricação, as feridas infectadas também são veículos de contaminação de alimentos. *S. epidermidis* é considerada a espécie de estafilococos coagulase negativo de maior prevalência e persistência na pele humana (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; GERMANO; GERMANO, 2011; LEVINSON; JAWETZ, 2002).

As doenças toxinogênicas ou intoxicações alimentares são provocadas pela ingestão de alimentos contaminados por toxinas produzidas por bactérias, fungos ou parasitas liberadas durante o processo da fabricação do alimento, sendo estas toxinas ingeridas junto aos alimentos, sendo responsáveis pelos sintomas apresentados das doenças (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; GAVA, 1998; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

Segundo Franco e Landgraf (1996), não são todos os alimentos contaminados por patógenos que podem causar uma doença, esse fato só pode vir a ocorrer quando estes microrganismos destruírem as defesas naturais do organismo do indivíduo (PLAYFAIR et al., 1999).

Dessa forma, nem todos os indivíduos que consomem o agente patogênico em um alimento contaminado vão desencadear os sintomas de uma Doença Transmitida por Alimentos, pois o período de incubação, o estado nutricional, idade e a sensibilidade individual e até mesmo o inóculo bacteriano ingerido influenciam na contaminação, alimentar que comumente pode gerar infecções alimentares (FALLER; MURRAY; ROSENTHAL, 2006).

3.4.3 *Salmonella*

São microrganismos comumente relacionados à doenças de origem alimentares; bacilos Gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbicos facultativos e oxidase negativa, pertencentes à família Enterobacteriaceae, sendo considerados

patogênico (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; SILVA et al., 2010; SHINOHARA et al., 2008; FELIPE; MIGUEL, 2011).

As *Salmonella* são encontradas em dois tipos, sendo a *Salmonella entérica* e a *Salmonella bongori*, que estão divididas em subgrupos. Destes subgrupos, a *Salmonella typhimurium* é uma das maiores responsáveis por infecção de origem alimentar (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; GAVA, 1998; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; SHINOHARA et al., 2008).

Na maioria das vezes, uma infecção por *Salmonella* em um indivíduo costuma causar enterocolite, que se desenvolve sem complicações e some depois de alguns dias, portanto estas gastroenterites são freqüentes. A toxina responsável por essa toxicoinfecção encontra-se principalmente na parede celular da bactéria e quando rompida é liberada no meio. Os sintomas são decorrentes de uma contaminação por um grande número de bactérias, uma vez que são eliminadas rapidamente do organismo, e apenas algumas conseguem sobreviver e se multiplicar em números suficientes de causarem os principais sintomas, entre oito a quarenta e oito horas após a ingestão de água e alimentos contaminados. Os principais sintomas relatados são náuseas, vômitos diarreias e febre, podendo ficar por até três dias após o surgimento dos primeiros sintomas, podendo ser fatal em crianças e idosos devido à menor resistência à infecção (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; TRABULSI et. al, 1999, GAVA, 1998; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

3.5 Legislação em relação à análise microbiológica de alimentos

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, estabeleceu padrões microbiológicos aceitáveis para diversos alimentos. A análise é realizada pela presença ou ausência do microrganismo, e através da técnica de número mais provável de bactérias desenvolvidas em meio favorável, conseguindo assim avaliar a segurança e a qualidade do alimento (BRASIL, 2001; SILVA et al. 2010).

Para sucos e refrescos “in natura” incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares isolados de mistura, são considerados toleráveis os seguintes valores: ausência de *Salmonella* sp/25 mL e até 10^2 UFC/mL para coliformes a 45°C, conforme Tabela 1 (BRASIL, 2001).

Segundo Santos (2014), a legislação brasileira (RDC nº 12, 2001) em vigor estabelece o valor máximo é aceitável o ponto de corte de 10^3 UFC/ml para *Staphylococcus aureus* para suco de frutas congeladas. Sugerindo que, contagens de bactérias aeróbias acima desse valor nas amostras podem indicar uso de matéria-

prima contaminada, processamento inadequado, ou ainda armazenamento insatisfatório, relacionado ao tempo e temperatura (BRASIL, 2001).

Apesar da legislação não exigir a análise microbiológica de *S.aureus*, em suco como componentes da microbiota das mãos, é de suma importância sua análise, pois podem comumente contaminar os alimentos manipulados artesanalmente como o suco e podem causar intoxicação alimentares. O ponto de corte que será adotado será 10^3 UFC/mL⁻¹ como aponta Santos (2014), para análise de suco de fruta congelada.

A final, as amostras serão avaliadas se estão aptas ao consumo sem representar risco à saúde humana; destacando a importância da microbiologia alimentos.

É necessário que os sucos de laranja natural comercializados apresentem qualidade microbiológica e, para tanto, deve ser feita a correta higienização de equipamentos e superfícies de contato e deve haver treinamento técnico para os manipuladores, sendo necessária, também, a fiscalização dos locais de vendas desses sucos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

De acordo com a Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, os órgãos de vigilância sanitária estadual, distrital e municipais visam abranger requisitos inerentes às realidades locais e promover a melhoria das condições higiênico-sanitárias dos serviços de alimentação (BRASIL, 2004).

Os procedimentos de Boas Práticas para serviços de alimentação devem ser feitas de acordo com a Resolução nº 206 de 15 de setembro de 2004:

Os manipuladores devem lavar cuidadosamente as mãos ao chegar ao trabalho, antes e após manipular alimentos, após qualquer interrupção do serviço, após tocar materiais contaminados, após usar os sanitários e sempre que se fizer necessário. Devem ser afixados cartazes de orientação aos manipuladores sobre a correta lavagem e anti-sepsia das mãos e demais hábitos de higiene, em locais de fácil visualização, inclusive nas instalações sanitárias e lavatórios. Os manipuladores de alimentos devem ser supervisionados e capacitados periodicamente em higiene pessoal, em manipulação higiênica dos alimentos e em doenças transmitidas por alimentos. A capacitação deve ser comprovada mediante documentação. Devem ser adotadas medidas para evitar que esses insumos contaminem o alimento preparado. As matérias-primas, os ingredientes e as embalagens devem ser armazenados em local limpo e organizado, de forma a garantir proteção contra contaminantes. O responsável pelas atividades de manipulação dos alimentos deve ser comprovadamente submetido a curso de capacitação, abordando, no mínimo, os seguintes temas: contaminantes alimentares; Doenças Transmitidas por Alimentos; manipulação higiênica dos alimentos e Boas Práticas (BRASIL, 2004).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das Amostras

Foram realizadas análises microbiológicas de amostras de suco natural de laranja, provenientes da produção artesanal de oito restaurantes da região sul de Palmas-TO, coletados nos meses de março a maio de 2016.

As amostras foram obtidas no horário de almoço das 11:00 às 13:00 horas da tarde pelos produtores normalmente como se fossem para consumo, todas amostras coletadas eram sem açúcar e sem gelo, identificadas e armazenadas em copos coletores estéreis, que em seguida foram guardados em uma caixa térmica higienizada, contendo gelo e devidamente lacrada.

Após a coleta, as amostras foram transportadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Luterano de Palmas para seguimentos aos testes de controle microbiológico.

4.2 Preparo das Amostras

Após adquirir as amostras de suco de laranja e higienizar externamente os copos coletores com álcool 70%, foram retirados 25ml de cada amostra que foram adicionadas à 225ml de água peptonada 0,1%, estéril, para obter a diluição inicial (10^{-1}).

Foi transferido 1ml desta diluição para um outro tubo contendo 9ml de água peptonada, tendo assim a diluição (10^{-2}), e novamente foi transferido 1ml para o terceiro tubo contendo 9ml de água peptonada, assim obtendo-se a diluição (10^{-3}) conforme Silva e colaboradores (2010).

4.3 Análise Microbiológica

4.3.1 Coliformes Totais e Termotolerantes

A técnica de análise para coliformes totais e termotolerantes adotada foi o método clássico de contagem de microrganismos do Número Mais Provável (NMP) que inclui o teste presuntivo e confirmatório (SILVA et al., 2010).

4.3.1.1 Teste Presuntivo

Para este procedimento, foi realizada a técnica dos tubos múltiplos com uma série de três tubos de ensaio com tubos de Durham invertidos contendo 10mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). A partir da diluição 10^{-1} foi inoculado 1ml da diluição em 3 tubos de LST, seguindo, a partir da segunda diluição (10^{-2}) foi inoculado 1ml da diluição em 3 tubos com 10ml de LST obtendo-se a segunda série de tubos. E a partir da diluição (10^{-3}) foi inoculada 1ml em 3 tubos de LST obtendo a terceira série de tubos (10^{-3}) (SILVA et al., 2010).

Todos os tubos foram levados para estufa a 35°C por 24-48h de incubação. Após o período de incubação os tubos que apresentaram crescimento, turvação e produção de gás no interior do tubo foram classificados como teste positivo, os que não tiveram nenhum tipo de alteração foram testes negativos (SILVA et al., 2010).

4.3.1.2 Teste Confirmatório

O teste para confirmação foi realizado nos tubos considerados positivos no teste presuntivo. Aos tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos e Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e Caldo de *E. coli* (EC) foram adicionados uma alçada de cada teste LST considerado positivo (SILVA et al., 2010).

Os tubos com VB contendo o inóculo foram levados para a estufa a 35°C por 24-48 horas. Após a estufa, os que tiveram crescimento, turvação e formação de bolhas no tubo (produção de gás), foram considerados positivos para coliformes totais, sendo de origem fecal ou não (SILVA et al., 2010).

Os tubos com EC foram incubados em banho- Maria a 45°C por 24h, sendo que após o período de incubação, os tubos que apresentaram crescimento e produção de gás foram considerados positivos para presença de coliformes termotolerantes (SILVA et al., 2010).

A seqüência de tubos positivos após a análise foi comparada com a tabela de NMP citado por Silva e colaboradores (2010), obtendo-se assim, os valores de NMP/mililitros do suco de laranja natural.

4.3.2 *Salmonella*

Para avaliar a presença de *Salmonella* sp. nas amostras analisadas, foi realizada a técnica de esgotamento em estrias na superfície, sendo transferido uma alçada da amostra para placas de petri com Ágar *Salmonella/Shigella*, sendo que

foram estriada, com movimentos de zig-zag, ate cerca da metade da placa, girar a placa e estriar ate a metade (1/4), girar mais e estriar o meio restante. Após o término do esgotamento em estrias, as placas foram levadas a estufa a 35°C por aproximadamente 24-48 horas. Depois do tempo de incubação, as mesmas foram retiradas da estufa e em seguida foi analisado o crescimento das colônias (SILVA et al., 2010).

Com intuito de avaliação e discussão dos resultados, os valores obtidos foram comparados com a Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, conforme a Tabela 1, e classificados como ausente e presente.

Tabela 1 - Padronização microbiológica usada para avaliação de suco natural de laranja

Microrganismo	Tolerância para a Amostra
Coliformes termotolerante	10 ² NMP/mL
<i>Salmonella sp.</i>	Ausência/ 25mL

Fonte: BRASIL (2001).

4.3.3 *Staphylococcus spp.*

Primeiramente, vale ressaltar que RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 não preconiza a análise de *Staphylococcus spp* para sucos e refrescos “in natura” entretanto por ser um microrganismo de microbiota das mãos e por ser patogênico foi interessante realizar a análise microbiológica desse microrganismo.

Para analisar a presença de *Staphylococcus* nas amostras foi utilizado o método de contagem direta em placas em Ágar Manitol, realizando a semeadura em superfície com auxílio de uma alça de Drigalski de 0,1mL das diluições obtidas das amostras (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³). Na sequência, as placas foram incubadas na estufa a 35°C por aproximadamente 24-48 horas. Após este período de incubação foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (SILVA et al., 2010).

Os resultados observados para a contagem de colônias de *Staphylococcus* foram pelo o cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), utilizando a equação abaixo:

$$\text{UFC} = \text{Número de colônias} \times \text{Fator de diluição/mL} \times 10$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 8 amostras de suco natural de laranja, avaliando os aspectos microbiológicos indicadores de qualidade higiênico-sanitário.

Após obter os resultados através da combinação de uma série de três tubos positivos, os valores foram observados na tabela de NMP, conforme citado por Silva e colaboradores (2010), para coliformes totais e termotolerantes.

Das 8 amostras avaliadas, todas apresentaram algum tipo de contaminação microbiológica. Na Tabela 2, é possível observar os resultados da análise para o teste confirmatório para Coliformes totais e termotolerantes.

Tabela 2 - Número Mais Provável encontrados nas amostras para Coliformes totais e termotolerantes da análise microbiológica de 8 amostras de suco natural de laranja comercializado em restaurantes da região sul do município de Palmas – TO.

Amostra	Coliformes totais (NMP/mL)	Coliformes termotolerantes (NMP/mL)
1	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
2	$>1,1 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$
3	$>1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
4	$1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
5	$2,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$
6	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
7	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$
8	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$

Das 8 amostras avaliadas no meio VB, todas apresentaram resultados positivos para a presença coliformes totais, sendo 50% das amostras em quantidade máxima (>1.100). Nos resultados para o teste de coliformes termotolerantes, houve uma amostra em que o resultado estava dentro do permitido pela legislação (amostra 5), com valor de $2,3 \times 10^1$ NMP/mL. As demais contaminadas, tendo 25% das amostras com valores máximos.

De acordo com os resultados obtidos, comparando-os com a Legislação Brasileira, observados na tabela 1, pode-se afirmar que 7 (87,5%), das amostras apresentaram coliformes termotolerantes, acima do permitido pela legislação, pois apresentaram valores superiores a 10^2 NMP/mL, então não estão próprias ao consumo.

A contaminação por coliformes pode ser proveniente da falha no processo de manipulação do produto, higienização das mãos, limpeza dos utensílios, armazenamento ou até mesmo na comercialização. Brito e Rossi (2005), na análise microbiológica em suco natural de laranja, encontraram valores para coliformes totais e termotolerantes acima do permitido, atribuindo a possíveis falhas no processo de manipulação do suco, armazenamento e comercialização.

Estudos feitos por Oliveira e colaboradores (2006), ao realizarem a análise microbiológica, e as condições de manipulação do suco natural de laranja, observaram que 37 (74%) amostras apresentaram coliformes totais e 57% coliformes termotolerantes, com valores fora do padrão estabelecido pela legislação, inferindo a presença a condições inadequadas de manipulação e estocagem, a presença de coliformes termotolerantes indica o contato do suco com material fecal, direta ou indiretamente.

De acordo com os estudos de Mallet e colaboradores (2014), das sete amostras de suco natural de laranja analisadas para coliformes, termotolerante, duas (29%) encontra-se fora dos padrões estabelecido pela legislação vigente e cinco (71%) estão dentro dos limites permitidos.

Os resultados do teste microbiológico para *Salmonella* sp. apresentaram positividade em todas as amostras testadas, conforme pode ser observado na Tabela 3. Quando comparado os resultados positivos para *Salmonella* sp. com a legislação vigente, concluiu-se que as 8 amostras são consideradas impróprias ao consumo, pois este microrganismo deveria estar ausente no suco de laranja.

Tabela 3 – Resultados encontrados para *Salmonella* sp. de 8 amostras de suco natural de laranja comercializados na região sul de Palmas – TO

Amostras	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/ml)
1	Presente	0
2	Presente	0
3	Presente	0
4	Presente	0
5	Presente	0
6	Presente	0
7	Presente	0
8	Presente	0

Estudos realizados por Garcia e colaboradores (2012), detectaram a presença de *Salmonella* sp em todas as amostras analisadas, sendo classificadas todas como inapropriada ao consumo, segundo a legislação brasileira, pois a ingestão deste microrganismo pode provocar infecção alimentar causando vômitos, náuseas e diarréias como sintomas.

Segundo Pinheiro et. al (2006) e Mallet et. al (2014) os resultados obtidos foram ausência de *Salmonella* sp em suas amostras de suco natural de laranja, porém nos estudos de Ruschel et.al, (2001) das 52 amostras somente 1 estava fora dos padrões da legislação vigente, e as demais amostras estava apropriada para o consumo.

Já a contaminação por *Staphylococcus* sp. foi negativa em todas as amostras do suco natural de laranja.

A contaminação por esses microrganismos está relacionada à qualidade sanitária do produto, assim, pode-se dizer que os manipuladores de alimentos dos locais como lanchonetes e restaurantes, muitas vezes não buscam informações ou treinamento para a manipulação de alimentos. Ainda que o produto tenha uma boa aparência quando oferecido ao consumidor, o produto pode não refletir a qualidade esperada, o que pode contribuir para um possível processo infeccioso (SOARES et al, 2011; BRITO; ROSSI, 2005).

6 CONCLUSÃO

Das amostras analisadas comercializadas na região sul de Palmas - TO, todas estão impróprias para consumo, pois a análise microbiológica apresentou a presença de *Salmonella* e de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação (RDC nº 12, 2001).

Os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a necessidade de um controle higienico maior para a produção de suco natural de laranja comercializado em restaurantes da regioao sul de Palmas - TO, a fim de se apresentarem dentro do padrão da legislação. Com isso, os resultados encontrados servem de alerta da necessidade de cuidado nas medidas higiênicas para o monitoramento das condições dos manipuladores, manuseio e armazenamento do suco natural de laranja.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, M. C. et al. Eficácia da sanificação no processamento mínimo de laranja 'pêra'. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 33, p.1866-1870, 2009.
- APTEKMANN, N. P. et al. Suco de laranja reduz o colesterol em indivíduos normolipidêmicos. **Nutrição**, Campinas, v. 5, n. 23, p.779-789, out. 2010
- BARBOSA, H. R.; TORRES, B.; FURLANETO, M. **Microbiologia Básica**. 3º Edição, Atheneu, São Paulo, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jan. 2001. 51 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 set. 2004. 12 p.
- BRITO, C. S.; ROSSI, D. A. Bolors e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja in natura e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**., Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 133-140, 2005.
- BROOKS, G. f; CARROLL, K. C; BUTEL, J. S; MORSE, S. A; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica**. 26ª edição. Editora Lange: Porto Alegre, 2014.
- CARVALHO, L. R. ; MAGALHÃES, J. T. de. Avaliação da qualidade microbiológica dos caldos de cana comercializados no centro de itabuna - BA e práticas de produção e higiene de seus manipuladores. *Revista Baiana de Saúde Pública*, Santa Cruz, v. 31, n. 2, p.238-245, 2007.
- CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos Alimentos**. Programa Escola Técnica Aberta do Brasil (ETEC). Recife: EDUFRPE, 2010.
- CUNHA, M. A.; SILVA, M. R. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 1, n. 1, p. 09-13, 2006.
- DELLA TORRE, J. C. M et al. perfil sensorial e aceitação de suco de laranja pasteurizado minimamente processado. *Ciencia Tecnológica Alimentos*, Campinas, v. 2, n. 23, p.105-111, ago. 2003.
- FALLER, M. A.; MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S. P. **Microbiologia médica**. 5ª edição. Editora Elsevier, p. 979, 2006.
- FELIPE, M. L.; MIGUEL, D. P. Análise da qualidade microbiológica do caldo de cana. *Revista Engenharia*, Uberaba, v. 8, p.77-82, 2011.
- FRANCO, B.D.G.DE M.; LANDGRAF, M.; **Microbiologia dos Alimentos**, 1º Edição, Editora Atheneu: São Paulo, 1996.

GARCIA, R. C. G; SANTOS, D. C.; OLIVEIRA, E. N. A; JOSINO, S. A. qualidade microbiológica de sucos in natura comercializados na cidade de Juazeiro do Norte-CE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 1, n. 6, p.665-670, 2012.

GAVA, A.J.; **Princípios de Tecnologia de Alimentos**, 1ª Edição, Livraria Nobel S.A., São Paulo, 1998

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.; Tecnologia de Alimentos: **Princípios e Aplicações**, São Paulo: Nobel, 2008.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.; **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**, 4ª Edição, Editora Manole Ltda.: Barueri – SP, 2011.

LEVINSON, W; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**, 7ª Edição, Editora Artmed: Porto Alegre, 2002.

MALLET, A. C. T.; BRUM, D. C. M.; SARON, M. L. G.; SOUSA, E. B.; COSTA, L. M. A. S. Qualidade microbiológica e físico-química de refrescos comercializados nos municípios de Barra Mansa e Volta Redonda-RJ. **Demetra: Alimentação, Nutrição e Saúde**, Volta Redonda, v. 4, n. 9, p.943-954, 2014.

MALLON, C.; BORTOLOZO, E. A. F. Q. Alimentos comercializados por ambulantes: uma questão de segurança alimentar. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 10, n. 3/4, p. 65-76, 2004.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; JUNIOR, J. P. Citros: Principais Informações e Recomendações de Cultivo. **Instituto Agronômico**, Cordeirópolis-SP, p. 1-9, 2005.

MEDEIROS, R. C.; MUSSER, R. S.; SILVA, M. M.; SANTOS, J. P. O.; JUNIOR, I. R. N. Análise Exploratória das Características Morfológicas e Qualitativas de Variedades de Laranjeiras de Mesa da Coleção em Brejão – PE. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 500-507, 2013.

OLIVEIRA, Juliana C. et al. Características microbiológicas do suco de laranja in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.2, p. 241-245, 2006.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M.; SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A. avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 1, n. 26, p.98-103, 2006.

PELCZAR, M.J.J; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R., **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, Vol.2, 2ª Ed., São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997.

PLAYFAIR, J; MIMS, C; ROITT, I; WAKELIN, D; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2ª Edição, Editora Manole Ltda, São Paulo, 1999.

RUSCHEL, C. K.; CARVALHO, H. H.; SOUZA, R. B.; TONDO, E. C. Qualidade microbiológica e físico-química de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 1, n. 21, p. 94-97, 2001.

SANTO, Livia Cristina Martins. **Qualidade microbiológica de polpa congelada de acerola proveniente de produção familiar e industrial**. 2014. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Biosistemas, Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, 2014.

SHIBOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella spp.*, Importante Agente Patogênico Veiculado em Alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, Pernambuco, v.13, n.5, p. 1674-1683, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R.; **Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos e Água**, 4ª Edição, Livraria Varela: São Paulo, 2010.

SILVA, P. T. et al. Sucos de laranja industrializados e preparados sólidos para refrescos: estabilidade química e físico-química. *Ciência Tecnológica Alimentos*, Campinas, v. 3, n. 25, p.07-2005, set. 2005.

SOARES, U. J. O.; SOUZA, G. R.; BARBOSA, A. H.; MARTINS, C. H. G.; PIRES, R. H. Detecção e identificação de leveduras em sucos de laranja natural comercializados. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 663-668, 2011.

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R., **Microbiologia**, 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N.; **Microbiologia**, 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira Biociências*, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p.44-48, 2010.