

## Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados<sup>1</sup>

Juan S del Aguila<sup>2</sup>; Fabiana F. Sasaki<sup>3</sup>; Lília S Heiffig<sup>2</sup>; Maria das Graças Ongarelli; Cláudio R. Gallo; Angelo Pedro Jacomino<sup>2</sup>; Ricardo Alfredo Kluge<sup>2</sup>

USP/ESALQ, C. Postal 9, 13418-900 Piracicaba-SP; E-mail: jsaguila@esalq.usp.br; <sup>2</sup>Bolsista CNPq; <sup>3</sup>Bolsista Fapesp

### RESUMO

O presente trabalho visou comparar dois tratamentos de sanitização e identificar alguns microorganismos associados ao processamento mínimo da raiz de rabanete. Foram avaliados dois métodos de sanitização: 1) sanitização convencional: raízes de rabanete minimamente processadas em retalhos receberam uma única sanitização, por 3 minutos em uma solução de 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo; 2) sanitização adicional: raízes de rabanete minimamente processadas foram inicialmente sanitizadas na “área suja”, numa solução de 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo por 10 minutos, para posteriormente ingressar na “área limpa”, e receber uma segunda sanitização nas mesmas condições do tratamento 1. As análises microbiológicas foram realizadas em duas fases: a) após o corte; e b) no 10<sup>o</sup> dia de armazenamento a 5°C (±1°C) e 90% (±5%) UR. Para cada dia de análise foram utilizadas 4 repetições de 130 g de raiz de rabanete minimamente processada. As contagens de bactérias psicrotróficas no tratamento 2 mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis. No tratamento 1 obteve-se, no 10<sup>o</sup> dia de armazenamento, 5,8 x 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup>, equivalente ao limite máximo recomendado. Não foi detectada presença de coliformes e *Salmonella* em ambos os tratamentos. Conclui-se que uma primeira sanitização, com 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo por 10 minutos, é recomendável para a obtenção de raízes de rabanete minimamente processadas de qualidade até o 10<sup>o</sup> dia de armazenamento a 5°C, permitindo a comercialização do produto dentro do estabelecido pela legislação vigente de alimentos frescos.

**Palavras-chave:** *Raphanus sativus* L., processamento mínimo, sanitização, microbiologia.

### ABSTRACT

#### Determination of microorganisms in fresh-cut radishes

The present work was carried out to compare two sanitation treatments and to identify some microorganisms associated with fresh cut radishes. Two sanitation methods were evaluated: 1) conventional sanitation: fresh cut radishes received a single sanitation, for 3 minutes in a solution of 200 mg L<sup>-1</sup> of active chlorine; 2) additional sanitation: fresh cut radishes were sanitized initially in a solution of 200 mg L<sup>-1</sup> of active chlorine for 10 minutes and later submitted to a second sanitation in the same conditions of conventional sanitation. The microbiological analysis was accomplished in two stages: a) just after the cut; and b) in the 10<sup>th</sup> day of storage at 5°C (±1°C) and 90% (±5%) RH. Four replicates of 130 g of fresh cut radishes were used for each day of analysis. The count of psychotropic bacteria in the additional sanitation stayed within the acceptable limits. However in the conventional sanitation at the 10<sup>th</sup> day of storage, psychotropic bacteria reached 5.8 x 10<sup>6</sup> CFU g<sup>-1</sup> equivalent to the maximum recommended limit. Coliforms and *Salmonella* were not detected in both treatments. A first sanitation, with 200 mg L<sup>-1</sup> of active chlorine for 10 minutes, is adequate to obtain desirable fresh cut radishes until the 10<sup>th</sup> day of storage at 5°C, allowing the commercialization of the product during the period established by the actual legislation for fresh cut products.

**Keywords:** *Raphanus sativus* L., fresh cut, sanitation, microbiology.

(Recebido para publicação em 16 de março de 2005; aceito em 18 de novembro de 2005)

Desde a última década, grandes mudanças no hábito de consumo de frutas e hortaliças vêm ocorrendo. Os consumidores desejam cada vez mais produtos de elevada qualidade e que apresentem facilidades de preparo ou consumo. Para atender a essa demanda, as indústrias de processamento de alimentos lançaram no mercado frutas e hortaliças manipuladas de tal forma que seus tecidos vivos mantenham as características do produto fresco (Oliveira & Valle, 2000).

A qualidade e a segurança de produtos minimamente processados dependem da contaminação inicial e serão influenciadas pelas etapas de produção. A ob-

tenção de um produto de qualidade e seguro para a saúde do consumidor requer o desenvolvimento de tecnologias avançadas que considerem os aspectos microbiológicos, fisiológicos, tecnológicos e sensoriais de todo o processo.

As frutas e hortaliças são hospedeiras de uma diversificada microflora, que normalmente não incluem os tipos patogênicos ao homem. Frutas e hortaliças intactas são quase sempre seguras para o consumo, pois sua casca superficial é uma barreira física e química eficaz à maioria dos microorganismos. Em hortaliças de raízes, a microflora predominante é composta por organismos do solo. Já a microbiota é composta por

bactérias do gênero *Erwinia* e *Pseudomonas*, que têm geralmente a vantagem de serem competidoras sobre outros organismos que potencialmente poderiam ser prejudiciais aos seres humanos (Cantwell, 2004).

Reconhecendo a importância crescente da segurança de alimentos, Sant'Ana *et al.* (2002) realizaram levantamento dos perigos biológicos associados ao processamento de hortaliças minimamente processadas, tendo por base a legislação vigente (Brasil-Resolução ANVISA/MS de 12/01/2001). Os autores obtiveram uma contagem elevada de coliformes (62%) e presença regular de *Escherichia coli* (26%) nas amostras; sen-

<sup>1</sup> Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada à USP/ESALQ

do que 33,3% das amostras, encontravam-se em desacordo com os padrões microbiológicos legais vigentes (especialmente no que se refere à *Escherichia coli*). Os resultados obtidos evidenciam uma probabilidade elevada de ocorrência de toxinfecções alimentares.

Nos produtos minimamente processados, os cortes da casca e a disponibilidade de nutrientes proveniente do suco celular das células danificadas pelo processamento causam um aumento no número e nos tipos de microorganismos. Além disso, a manipulação dos produtos aumenta a possibilidade de contaminação com organismos patogênicos.

O crescimento microbiano nos produtos minimamente processados é controlado, principalmente, com a utilização de hortaliças de ótima qualidade, sanitização e baixas temperaturas. A sanitização dos equipamentos e o uso de água tratada com cloro são procedimentos padrões. A temperatura baixa durante e após o processamento geralmente retarda o crescimento microbiano, podendo selecionar o meio para o crescimento de organismos psicrotróficos, como *Pseudomonas*. Além disso, o excesso de umidade aumenta o crescimento microbiano, conseqüentemente, a remoção da água de lavagem e de sanitização pela centrifugação é crítica (Cantwell, 2004).

A sanitização dos produtos hortícolas minimamente processados desempenha importante papel na manutenção da qualidade do produto, diminuindo o número de microrganismos contaminantes presentes e aumentando seu período de vida de prateleira (Oliveira & Valle, 2000), necessitando de um maior controle de tempo de exposição e concentração do sanitizante adotado (Sant'Ana *et al.*, 2002).

Este trabalho visou identificar microorganismos do gênero *Salmonella* associados ao processamento mínimo de raízes de rabanete, por meio da contagem total de bactérias psicrotróficas e número mais provável (NMP) de coliformes totais em função de duas metodologias de sanitização.

## MATERIAL E MÉTODOS

Maços (folhas e raízes) de rabanete da variedade 'Crimson Gigante', colhi-

dos na região de Piracicaba, foram transportados até o laboratório da ESALQ, onde foram selecionados quanto à firmeza, ausência de danos mecânicos e infecções visíveis. A temperatura do laboratório foi regulada para 18°C. Posteriormente, os maços foram armazenados a 10°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e 90% ( $\pm 5\%$ ) UR (umidade relativa), por um período de 12 h, até o processamento. Para não haver problemas de contaminação cruzada entre os tratamentos, cada lote, tendo recebido a sanitização, passou por todas as etapas do processamento até a embalagem e armazenamento na câmara fria.

### Processamento mínimo

As etapas iniciais de processamento mínimo foram realizadas à temperatura de 18°C, tendo sido utilizados equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas, gorros, máscaras, aventais e botas, para sua perfeita realização. A seguir, são relacionadas as etapas do processamento, na denominada "área suja":

**Seleção 1:** com a utilização de uma faca bem afiada, as raízes de rabanete foram separadas das folhas, descartaram-se aquelas com problemas indesejáveis ao processamento.

**Lavagem:** utilizando-se água corrente, as raízes selecionadas foram lavadas a fim de que a matéria orgânica e demais impurezas aderidas ao produto fossem retiradas do mesmo.

**Sanitização adicional:** rabanetes minimamente processados em retalhos foram inicialmente sanitizados na "área suja", numa solução de 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo por 10 min, para posteriormente ingressar na "área limpa", e receber uma segunda sanitização por 3 min em uma solução de 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo. O sanitizante utilizado foi o SUMAVEG, produto que tem como princípio ativo o Dicloro-S-Triazinatriona Sódica Diidratada e é fabricado pela Diversey Lever-Indústrias Gessy Lever Ltda.

**Preparo do material:** as raízes foram cortadas numa processadora industrial (Robot Coupe®, CL50 version D), a qual realizou o corte do material em retalhos, com uma espessura de 2 mm.

**Enxágüe 1:** após o corte em retalhos, o material foi acondicionado em

saco de nylon, e submerso em água destilada a 5°C, para resfriamento e retirada do suco celular resultante do corte.

**Sanitização Convencional:** rabanetes minimamente processados em retalhos receberam uma única sanitização (na "área limpa"), por 3 min em uma solução de 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo.

**Enxágüe 2:** depois de sanitizadas, as raízes de rabanete foram submersas em água destilada, contendo 3 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo, por 1 minuto, retirando-se o excesso de cloro. Para minimizar os efeitos indesejáveis do corte sobre o metabolismo do produto utilizou-se água em baixa temperatura.

**Centrifugação:** o saco de nylon contendo as raízes de rabanete processadas foi introduzido em uma centrífuga por 1 minuto, na rotação média de 2.000 rpm, eliminando-se o excesso de água presente no produto em decorrência dos enxágües e da sanitização.

**Seleção 2:** foram descartadas as raízes de rabanete não padronizadas para a comercialização.

**Embalagem:** o produto foi embalado em bandejas de poliestireno expandido, com dimensões de 14 x 20 cm de largura e comprimento, respectivamente, envoltas com filmes de PVC (policloreto de vinila) com 14 mm de espessura, onde foram colocadas 130 g de raiz de rabanete minimamente processado. No total, foram preparadas quatro bandejas para cada tratamento.

**Armazenamento:** as bandejas foram armazenadas na câmara fria, à temperatura de 5°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e 90% ( $\pm 5\%$ ) UR, por um período de 10 dias.

### Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas no dia do processamento e no 10º dia de armazenamento, uma vez que mantidos os limites permitidos na legislação nesse período, o produto não apresentará risco microbiológico ao consumidor. Normalmente os produtos minimamente processados ficam em exposição nos balcões refrigerados dos supermercados por 3 a 6 dias. A microbiota contaminante do rabanete minimamente processado foi avaliada pela presença ou ausência de *Salmonella*, contagem total de bactérias psicrotróficas e número mais provável (NMP) de coliformes totais.

### Deteção de *Salmonella*

Para deteção de *Salmonella* utilizou-se o Kit "1-2 test", fabricado pela BioControl/USA. Trata-se de um método oficial aprovado pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). Foi feito um pré-enriquecimento de cada amostra analisada, inoculando-se 25 g de raiz de rabanete minimamente processada em um erlenmeyer contendo 225 ml de caldo lactosado, estes foram incubados em estufa a 35°C por 24 h. Com o pré-enriquecimento, a multiplicação da bactéria é favorecida. Fez-se o preparo dos kits, compostos, cada um, por dois compartimentos. Uma amostra pré-enriquecida (0,1 ml) foi inoculada na câmara de inoculação, onde primariamente foi adicionada uma gota de solução de iodo-ioduro e removendo-se depois, com auxílio de uma pinça estéril, o tampão desta câmara. A câmara de motilidade contém um meio não seletivo. Esta câmara é fechada por uma pequena ponteira (que foi retirada) para formar um vão no gel, e adicionou-se uma gota da solução de anticorpos polivalentes anti-*Salmonella*. Incubaram-se os kits a 35°C por 24 a 48 h. A possível presença de *Salmonella* é caracterizada pela formação de uma imuno-banda na metade superior do gel na câmara de motilidade. Trata-se de uma banda branca que apresenta forma de U, formada pela aglutinação das células da bactéria com a solução de anticorpos.

### Contagem total de bactérias psicrotróficas

Para a contagem de bactérias psicrotróficas (qualquer bactéria cujo ótimo de temperatura para crescimento situa-se acima de 20°C, porém, toleram e crescem sob refrigeração) utilizou-se o meio Ágar Padrão para Contagem (PCA). A partir da diluição de  $10^{-1}$  até  $10^{-3}$ , as raízes de rabanetes foram plaqueadas em profundidade, com 1 ml de cada diluição em duplicata, acrescentando-se  $\pm 20$  ml do meio PCA; fazendo movimentos das placas em forma de "8" para homogeneizar o meio. Após o plaqueamento, as placas permaneceram em repouso até completa solidificação do meio, sendo, então invertidas e incubadas a 7°C por 10 dias (Vanderzant &

**Tabela 1.** Contagem total de bactérias psicrotróficas, em rabanetes minimamente processados, utilizando-se a metodologia convencional (PCA). Piracicaba, ESALQ, 2005.

Tratamentos	Contagem total bactérias psicrotróficas*	
	Dia do tratamento/5°C	10 dias após tratamento/5°C
Sanitização convencional	$64,0 \times 10^2$	$58,0 \times 10^5$
Sanitização adicional	$5,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10^5$

\*Os resultados obtidos representam a média aritmética das UFC (unidades formadoras de colônias/g de produto).

Splittstoesser, 1992). Decorrido o tempo de incubação, foram selecionadas as placas e fez-se a contagem das mesmas, com auxílio do contador de colônias tipo Quebec.

### Número mais provável (NMP) de coliformes totais

Coliformes totais foram determinados pelo método do NMP, pela técnica dos Tubos Múltiplos, que consta de duas fases distintas: a fase do teste presuntivo, onde se busca detectar a presença de microrganismos fermentadores de lactose e onde é possível recuperar células injuriadas; e a fase do teste confirmativo, pelo qual se determina a população real de coliformes totais e fecais. Para o teste presuntivo foram utilizadas séries de cinco tubos de ensaio, cada um contendo um tubo de Durham e caldo Lauril. O caldo é fermentado pelas bactérias do grupo coliforme, com produção de ácido e gás. Uma amostra contendo 50 g foi batida no liquidificador com 450 ml de água peptonada, equivalente a diluição  $10^{-1}$ . Foram pipetados 10ml da diluição anterior, a qual foi completada com 90 ml de água peptonada, perfazendo a diluição de  $10^{-2}$ , e, para finalizar as diluições, foram pipetados 10 ml da diluição de  $10^{-2}$ , completando-se a mesma com 90ml de água peptonada, perfazendo a diluição de  $10^{-3}$ . De cada diluição foi retirado 1 ml que foi colocado em tubos de ensaio, que em seguida foram incubados em estufa a 35°C por 24 a 48 h.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem inicial de bactérias psicrotróficas foi de  $64 \times 10^2$  UFC  $g^{-1}$  para o tratamento com sanitização convencional e de  $5 \times 10^2$  UFC  $g^{-1}$  para o tratamento com uma sanitização adicional (Tabela 1). No 10º dia de

armazenamento as contagens obtidas aumentaram para valores próximos de  $58 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  e  $2,2 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$ , para o tratamento convencional e o com sanitização adicional, respectivamente. Vitti (2003) encontrou aumento na população de microrganismos psicrotróficos em beterraba minimamente processada, de  $2,62 \times 10^2$  para  $2,04 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ , após 10 dias de armazenamento do produto a 5°C. Pilon (2003) observou aumento de  $10^2$  para  $10^5$  UFC  $g^{-1}$  na contagem de microrganismos psicrotróficos em amostras de cenoura minimamente processadas, armazenadas a 1°C.

Não foram detectados coliformes em nenhum dos tratamentos, durante 10 dias de armazenamento refrigerado, o que sugere ausência de tais microrganismos na matéria-prima e indica que o processamento foi conduzido sob condições higiênico-sanitárias adequadas. Resultados similares foram obtidos por Vitti (2003), trabalhando com beterraba minimamente processada em retalhos e armazenada a 5°C.

Embora não existam, na legislação brasileira vigente, padrões para bactérias psicrotróficas totais e coliformes totais, tem sido preconizado que alimentos com contagens microbianas acima de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  podem ser impróprios para o consumo humano, devido à perda de valor nutricional, alterações organolépticas, riscos de deterioração e toxinfecções (Caruso & Camargo, 1984). Não foi observada presença de coliforme totais nos tratamentos aplicados. Outrossim, para as bactérias psicrotróficas, o tratamento com sanitização adicional apresentou limite inferior ao descrito anteriormente, enquanto que para o tratamento convencional, observou-se no limite superior ao máximo recomendado (Tabela 1).

Não foi detectada a presença de *Salmonella* em nenhum dos tratamentos analisados. Tais resultados qualificam as amostras analisadas em acordo com a Resolução RDC Nº12 de 02 de janeiro de 2001, da ANVISA do Ministério da Saúde, que estabelece para hortaliças *in natura* a ausência de *Salmonella* (em 25 g de produto), visando a preservação da saúde pública. Vitti (2003) também observou ausência de *Salmonella* em beterraba minimamente processada armazenada a 5°C.

Como não foi observada presença de bactérias coliformes totais e de *Salmonella* nas amostras dos tratamentos analisados, ficou evidenciada a importância de se utilizar matéria-prima de qualidade, segura do ponto de vista microbiológico e dos cuidados higiêni-

co-sanitários realizados durante as etapas de processamento do produto, enquadrando-o nos padrões microbiológicos vigentes no país.

A utilização de uma sanitização adicional com duração de 10 min na “área suja”, com 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro ativo, antes da entrada do produto na “área limpa”, adicionado ao fluxograma convencional de preparo da raiz de rabanete minimamente processada é recomendado para assegurar um produto de qualidade.

#### LITERATURA CITADA

CANTWELL M. 2004. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. *University of California, Vegetable Research & Information Center*, Disponível em: <<http://vric.ucdavis.edu/selectnewtopic.minproc.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2004.

CARUSO JGB; CAMARGO R. 1984. Microbiologia de Alimentos. In: CAMARGO, R. (Ed.). *Tecnologia dos produtos agropecuários-alimentos*. São Paulo: Nobel, p. 35-49.

OLIVEIRA ECM; VALLE RHPD. 2000. Aspectos microbiológicos dos produtos hortícolas minimamente processados. *Higiene Alimentar*, 14: 50-54.

PILON L. 2003. *Estabelecimento da vida útil de hortaliças minimamente processadas sob atmosfera modificada e refrigeração*. 111 f. (Dissertação mestrado), ESALQ, USP, Piracicaba.

SANT'ANA A; AZEVEDO DP; COSTA M. 2002. Análise de perigos no processamento mínimo de vegetais. *Revista Higiene Alimentar*, 16: 80-84.

VANDERZANT C; SPLITTSTOESSER DF. 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association, 1219 p.

VITTI DMC. 2003. *Aspectos fisiológicos, bioquímicos e microbiológicos em beterrabas minimamente processadas*. 116 f. (Dissertação mestrado), ESALQ, USP, Piracicaba.