

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE TEORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS EM CALDO DE CANA COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE GASPAR-SC

J.G.Q. Santos¹, G.A. Espindula¹, M.C. Ebel¹, J.R. Zendron¹, D. Hartmann¹, H.F. Nunes¹

1-Laboratório de Microbiologia – Instituto Federal de Santa Catarina – CEP: 89110-971 – Gaspar – SC – Brasil, Telefone: +55 (47) 33318-3700 – e-mail: hendrie.nunes@ifsc.edu.br

RESUMO – O caldo de cana é uma bebida energética muito consumida pelos brasileiros, sendo produzida, na maioria das vezes, de modo artesanal, o que implica em manter boas condições higiênico-sanitárias. Deste modo, este estudo objetivou avaliar se o caldo de cana comercializado em Gaspar-SC atende ao padrão microbiológico estabelecido pela RDC 12/2001 e se os teores de sólidos solúveis podem ser utilizados como indicativo de contaminação das amostras. Para tanto, análises microbiológicas de coliformes totais e termotolerantes e de sólidos solúveis foram avaliadas em amostras de caldo de cana coletadas em quatro estabelecimentos, em dois momentos distintos. Os resultados apontam que 75% das amostras estavam acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/mL para coliformes totais e 25% das amostras estavam em discordância com a RDC 12/2001 para coliformes termotolerantes, sugerindo deficiências higiênico-sanitárias em alguns estabelecimentos avaliados. A alteração dos teores de sólido solúveis analisadas na mesma amostra, em dois momentos distintos, sugere a existência de uma possível correlação com a contaminação por coliformes totais.

ABSTRACT – Sugarcane juice is an energy drink that is much consumed by Brazilians, being produced, most of the time, artistically, which implies maintaining good hygienic-sanitary conditions. In this way, this study aimed to evaluate if the sugarcane juice marketed in Gaspar-SC meets the microbiological standard established by RDC 12/2001 and if the levels of soluble substances can be used as an indicator of contamination of the substances. Therefore, microbiological analyzes of total and thermotolerant coliforms and soluble solids were evaluated in sugarcane juice samples collected in four establishments, at two different times. The results show that 75% of the samples were above 1.1×10^3 NMP/mL for total coliforms and 25% of the quantities were in disagreement with RDC 12/2001 for coliform thermotolerant, suggesting hygienic-sanitary deficiencies in some establishments evaluated. The change in the content solid soluble analyzed in the same sample, at two different times, suggests the occurrence of a possible correlation with contamination by total coliforms.

PALAVRAS-CHAVE: segurança alimentar; coliformes; doença transmitida por alimentos.

KEYWORDS: food safety; coliforms; disease transmitted through food.

1. INTRODUÇÃO

O caldo de cana ou garapa é extraído da cana-de-açúcar prensada, sendo servida com gelo e, muitas vezes, adicionando-se frutas ácidas ou semi-ácidas, como abacaxi, limão e maracujá (Simionato; Manfe, 2017).

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



Como bebida, o caldo apresenta elevado valor energético, por ser rico em carboidratos e pobre em proteínas, sendo muito aceita pela população, pois é muito saboroso, refrescante e de baixo custo (Prado et al., 2010; Brezovsky et al., 2016). Além disso, apresenta valores significativos de sais minerais, como o potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P) e ferro (Fe), e de algumas vitaminas do complexo B e vitamina C (Fava, 2004; Prado et al., 2010; Taco, 2011). No entanto, estas substâncias podem sofrer variação em sua composição, sendo muito afetada pelas condições edafoclimáticas, tratos culturais e pela variedade da cana (Figueiredo et al., 2008).

Em virtude, desta ampla gama de nutrientes, o caldo de cana é considerado um ótimo suplemento natural que ajuda na restauração do glicogênio muscular e na hidratação corporal. Além disso, auxilia na recuperação do sistema imunológico pela quantidade de vitaminas que apresenta e, combinado a outras frutas, é um excelente antioxidante que ajuda a proteger as membranas celulares (Fava, 2004).

Segundo resolução normativa de N° 218/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA), o caldo de cana está enquadrado como uma bebida preparada com vegetais, sendo classificado como substância ou mistura de substâncias obtidas da polpa ou de outras partes de vegetais, acrescida ou não de outros ingredientes, destinada ao consumo humano (Brasil, 2005).

O caldo extraído da cana é uma bebida levemente ácida ($\text{pH} > 4,6$), com alta concentração de sacarose (17%) e elevada atividade de água ($A_w=0,99$), sendo assim considerada um ótimo meio nutriente para desenvolvimento de microrganismos (Silva et al., 2016). Segundo Gorke e Stulke (2008), em meio com grande mistura de açúcares, as bactérias geralmente consomem estes açúcares sequencialmente em processo conhecido como repressão catabólica. Em *E. coli*, a repressão catabólica de glicose é regulada pelo sistema fosfotransferase, uma cascata de fosforilação multiproteica que combina a captação e o metabolismo de glicose. Em relação capacidade de metabolismo da sacarose, existem poucas linhagens de *E. coli* que fazem este processo com crescimento acelerado, sendo um desafio encontrar diferentes linhagens com a capacidade de utilizarem eficientemente este substrato, a fim de que se possa serem aproveitadas em processos industriais (Mohamed et al., 2019).

Muitos destes microrganismos promovem a deterioração do caldo de cana e são oriundos da própria cana, do solo e também de focos de contaminação nas moendas e em outros equipamentos e, ainda, dos manipuladores de alimentos (Kunitake, 2012). Durante a produção do caldo de cana, o manipulador deverá ter cuidados para que não ocorra a introdução de microrganismos, ou a multiplicação daqueles já presentes na cana. Além disso, o mesmo deverá realizar o descarte correto do bagaço da cana evitando deixá-lo próximo à moenda, a fim de evitar atrair insetos e roedores, uma vez que podem favorecer a ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (Prado et al., 2010).

Os principais grupos de microrganismos associados ao caldo de cana são os fungos, bactérias lácticas e esporuladas. As bactérias mais frequentes são as do gênero *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium*. Como leveduras, podem-se citar *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (França, 2008). Apesar desta ampla gama de microrganismos, a ANVISA, por meio da resolução N° 12/2001, estabelece que os padrões a serem realizados para as avaliações microbiológicas do caldo de cana são apenas a contagem de coliformes totais e termotolerantes (Brasil, 2001).

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família das *Enterobacteriaceae*. Nesse grupo estão apenas as enterobactérias com capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Os coliformes termotolerantes, também conhecidos como coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, com 44,5°C em 24 horas (Silva et al., 2007).

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

Em 2005, um surto de doença de Chagas, em Santa Catarina, se deu a partir da ingestão de caldo de cana contaminado pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, levando algumas pessoas a morte. Após este episódio, a ANVISA criou um regulamento técnico (RDC 218/2005), cujo objetivo é orientar os comerciantes de alimentos e bebidas preparadas com vegetais a manipularem, de forma segura, os alimentos, evitando novos surtos de doenças (Brasil, 2005).

Embora haja a regulamentação técnica, muitos comerciantes não a seguem com o devido rigor, quer seja falta de fiscalização, ou pelo próprio desconhecimento dos procedimentos higiênico-sanitários que devem ser realizadas durante todo o processo, que vai desde a manipulação da cana-de-açúcar até o caldo de cana a ser servido para o cliente (Pina et al., 2018).

Diante do exposto, realizou-se uma avaliação, quanto ao atendimento do padrão microbiológico estabelecido pela ANVISA através da resolução N° 12/2001, dos caldos de cana *in natura* produzido e comercializado no município de Gaspar-SC. Além disso, procurou-se averiguar possíveis relações dos teores de sólidos solúveis quanto a contaminação das amostras por coliformes totais e termotolerantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A coleta, transporte e estocagem das amostras seguiram as recomendações da *American Public Health Association* (APHA), que podem ser encontradas na 5ª edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Salfinger & Tortorello, 2015) e nas normas da *International Organization for Standardization* (Silva et al., 2017).

As amostras foram coletadas em quatro estabelecimentos, em dois dias distintos, no mês de dezembro de 2019. Após as coletas das amostras procedeu-se a identificação das mesmas e, em seguida, armazenou-se para o transporte em caixas de isopor resfriadas com gelo (Silva et al., 2017). Logo após, as amostras foram levadas ao laboratório de microbiologia para realização das análises seguintes.

A análise microbiológica foi realizada utilizando o método do Número Mais Provável (NMP) proposto pela *American Public Health Association* (APHA) descrito no capítulo 9 da 5ª edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kornacki et al, 2015).

Na primeira etapa foram realizadas as diluições seriadas (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}). Para chegar na diluição de 10^{-1} foram adicionados 25 mL de caldo de cana em 225 mL de água peptonada (H_2Op) a 0,1% em um recipiente. Depois, foi pipetado 1 mL da diluição de 10^{-1} em tubos de ensaio contendo 9 mL de H_2Op , obtendo-se a diluição 10^{-2} . E, por fim, para se obter a diluição 10^{-3} , pipetou-se 1mL da diluição de 10^{-2} e transferiu-se para os tubos com 9 mL de H_2Op . Antes das transferências das amostras, as diluições foram homogeneizadas 25 vezes.

Após este procedimento, procedeu-se à inoculação das amostras preparadas na diluição seriada (teste presuntivo). Para tanto, foram selecionadas três alíquotas de 1mL de cada uma das diluições seriadas em tubos de ensaio com *Durhan* invertidos contendo 9 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Em seguida, as amostras foram incubadas em uma estufa a 35°C durante 24h-48h para observar o crescimento e produção de gás, em caso positivo.

Para a contagem de coliformes totais (teste confirmativo), as amostras positivas do teste presuntivo foram transferidas com o auxílio de cabo de *kolle* e alça de platina para tubos de ensaios contendo 10mL do meio de cultura caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB). Em seguida, os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas. Após esse período, observou-se a produção de bolhas de gás nos tubos de *Durhan* (tubos positivos). Para a contagem

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

de coliformes termotolerantes, as culturas positivas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL do caldo *E. coli* (EC), com o auxílio de um cabo de *kolle* e alça de platina. Posteriormente, esses tubos foram incubados em banho-maria a 44,5°C por 24 horas e observou-se a produção de gás nos tubos de *Durhan* (tubos positivos).

Além disso, foi realizada a avaliação dos teores de sólidos solúveis por refratometria (°Brix), em amostras no instante da coleta e no momento das análises microbiológicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados para os teores de sólidos solúveis e análises microbiológicas das amostras de caldo de cana *in natura*. Observa-se que 25,0% das amostras apresentaram coliformes termotolerantes acima $1,0 \times 10^2$ NMP/mL, estando em desacordo com o limite estabelecido pela ANVISA. E, embora não exista regulamentação para coliformes totais, constatou-se que 75,0 % das amostras apresentaram valores superiores a $1,1 \times 10^3$ NMP/mL. Em relação aos teores de sólidos solúveis, percebeu-se que as amostras com uma diferença maior que 1,6 °Brix e tempo entre as análises superiores a 100 minutos também apresentaram valores superiores $1,1 \times 10^3$ NMP/mL para coliformes totais.

Tabela 1 - Resultados das análises de teores de sólidos solúveis e microbiológicas coletadas em amostras de caldo de cana comercializados em estabelecimentos do município de Gaspar-SC (2019)

Pontos de coleta	Coliformes Totais (NMP/mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/mL)	Teor de Sólidos Solúveis (°Brix)			Tempo** (minutos)
			Coleta	Análise	Diferença	
A ¹	$>1,1 \times 10^3$	$<3,0 \times 10^0$	19,0	17,0	2,0	100
A ²	$>1,1 \times 10^3$	$<3,0 \times 10^0$	17,0	14,0	3,0	120
B ¹	$>1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$ *	17,2	17,2	0	30
B ²	$>1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$	20,0	20,0	0	60
C ¹	$7,5 \times 10^1$	$7,5 \times 10^1$	19,5	19,5	0	180
C ²	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$ *	18,8	18,8	0	165
D ¹	$>1,1 \times 10^3$	$<3,0 \times 10^0$	19,0	17,2	1,8	180
D ²	$>1,1 \times 10^3$	$3,6 \times 10^1$	20,0	18,4	1,6	180

*Número superior ao previsto pelo regulamento da ANVISA (RDC Nº 12/2001) para coliformes termotolerantes ($1,0 \times 10^2$ NMP/mL). Não existem valores de referência para os coliformes totais. ** Diferença de tempo entre horário de coleta e realização da análise microbiológica da amostra

Fonte: os autores (2020)

Em pesquisa realizada por Souza et al (2017), em estabelecimentos que comercializam caldo de cana *in natura* no município de Curitiba-PR, foi constatado que 60% das amostras apresentaram valores em discordância com os limites estabelecidos pela ANVISA para os coliformes termotolerantes. Por outro lado, as mesmas análises em amostras de caldo de cana *in natura* realizadas em pesquisa por Galvão et al (2019) no município de Campo Mourão-PR encontraram-se dentro do limite estabelecido, porém 40% das amostras foram superiores a $1,1 \times 10^3$ NMP/mL para coliformes totais.

Os resultados positivos para coliformes totais indicam más condições higiênicas do local, do produto e/ou na manipulação, uma vez que podem ser transmitidos pelos manipuladores de alimentos, por insetos ou pela



água (Ferreti & Alexandrino, 2013). Por outro lado, amostras com indicativo de contaminação por coliformes termotolerantes demonstram que a manipulação, o armazenamento e a comercialização deste produto devem sempre ser monitorados com o intuito de minimizar a contaminação, haja vista que denotam a precariedade da qualidade higiênico-sanitárias do alimento e refletem a possibilidade de contaminação fecal (Galvão et al, 2019).

Os valores dos teores de sólidos solúveis (°Brix) das amostras de caldo de cana *in natura* avaliados parece indicar uma possível existência de correlação com a presença de coliformes totais, quando avaliadas com o interstício mínimo de horas entre as avaliações da coleta e das análises no laboratório. Uma hipótese para este resultado é a de que nas amostras de caldo de cana contaminadas por bactérias do grupo das coliformes totais possa estar ocorrendo um crescimento acelerado, em função da capacidade de metabolismo da sacarose, fato que só ficaria visível após um período superior a 100 minutos. No entanto, cabe destacar que, mais avaliações serão necessárias, com um maior número amostral em vários horários distintos, para que se possa utilizar essa informação dos teores de sólidos solúveis como uma ferramenta mais prática, barata e eficiente na indicação de contaminação de uma amostra de caldo de cana por coliformes totais. Além disso, ressalta-se que estes valores de °Brix apontam que as variedades se encontram em estágio inicial de maturação e que, provavelmente, atende aos índices indicativos de aceitação para consumo (Soares et al, 2017).

4. CONCLUSÕES

As análises microbiológicas das amostras nos quatro estabelecimentos avaliados no município de Gaspar-SC sugerem deficiências higiênico-sanitárias no processo de obtenção do caldo de cana. Isso demonstra a necessidade de melhorias nas técnicas de produção, incluindo cuidados higiênicos com o ambiente de trabalho, os equipamentos e utensílios. Ações educativas serão sugeridas como orientação para os proprietários dos estabelecimentos. Além disso, a diminuição dos teores de sólidos solúveis nas amostras de caldo de cana, entre as duas avaliações realizadas, poderá estar indicando uma possível contaminação por coliformes totais, após um período de tempo superior a aproximadamente duas horas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq/PIBIC-EM e ao IFSC pelas concessões das bolsas para realização da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anvisa. Resolução de diretoria colegiada - RDC nº 12. *ministério da saúde*, 10 jan 2001.
- Bhupinder, K.; Sharma, K.P.; Harinder, K. Studies on the development and storage stability of ready to serve bottled sugarcane juice. *International Journal of Tropical Agriculture*, v.9, n.2, p.128-134, 1991.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 218, de 29 de julho de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos higiênico-sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais. *Diário Oficial do Brasil*, Brasília, DF, 1 de agosto de 2005.
- Brasil. Ministério da Saúde. Anvisa- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 02 de janeiro de 2001. p.1-54.
- Brezovsky, F. R.; Valiatti, T. B.; Romão, N. F.; Passoni, G. P.; Sobral, F. O. S. Avaliação Microbiológica e Microscópica do Caldo de Cana Comercializado em Ji-Paraná. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v. 20, n. 2, p. 111-115, 2016.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- Fava, A. R. Atletas ingerem garapa para repor energia. *Jornal da UNICAMP*, Campinas, p.3-9, 2004.
- Figueiredo, I. C.; Ferreira, B. F.; Marques, M. O. A qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de álcool. *Nucleus*, edição Especial, p. 82-92, 2008.
- França, A. F. Consumo de caldo de cana, risco à saúde da população: Uma Revisão. Recife, 2008. 30 f. *Monografia*. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Recife, 2008.
- Galvão, K. N. C; Teixeira, V. M. C; Campos-Shimada, L. B; Bagatin, M. C; Valoto, A. L. O. Análise microbiológica do caldo de cana comercializado por vendedores ambulantes no município de Campo Mourão-PR, *Sabios-Revista de Saúde e Biologia*, v.14, n.1, p.21-26. 2019.
- Görke, B.; Stülke, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p.613-624, 2008.
- Kornacki, J.L; Gurtler, J.B; Stawick, B.A. *Enterobacteriaceae, coliforms, and Escherichia coli as quality and safety indicators*. In: Salfinger, Y; Tortorello, M.L. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 9(5) ED. American Public Health Association, Washington, p. 103-120. 2015.
- Kunitake, M. T. Processamento e estabilidade de caldo de cana acidificado. 2012, 129 f. *Dissertação* (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, 2012.
- Mohamed, E.T.; Mundhada, E.; Landberg, J.; Cann, I.; Mackie, R.I.; Nielsen, A. T.; Herrgård, E. A.; Feist, A. M. Generation of an E. coli platform strain for improved sucrose utilization using adaptive laboratory Evolution. *Microbial Cell Factories*, v.18, n.116, 14p., 2019.
- Pina, F. A. N.; Espinheira, M. J. C. L.; Souza, F. M. Análise Parasitológica de Caldos de Cana Comercializados em Feiras Livres em uma Cidade no Interior da Bahia. *Revista Multidisciplinar e Psicologia*, v.12, n.40, p.859-869, 2018.
- Prado, S. P. T.; Bergamini, A. M. M.; Ribeiro, E. G. A.; Castro, M. C. S.; Oliveira, M. A. Avaliação do perfil microbiológico e microscópico do caldo de cana in natura comercializado por ambulantes. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo, v. 69, n. 1, p. 55-61, 2010.
- Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5ª ed. Washington: *American Public Health Association (ALPHA)*, 2015.
- Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A.; Taniwaki, M. H.; Gomes, R. A. R.; Okazaki, M. M. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. 5º ed., São Paulo: Bulcher, 2017, 535 p.
- Silva, C. O; Gallo, F. A.; Bomdespacho, L. Q.; Kushida, M. M.; Petrus, R. R. Sugarcane Juice Processing: Microbiological Monitoring. *Journal of Food Process Technology*, v. 7, p. 1-5, 2016.
- Simionato, E. M. R. S.; Mafei, T. D. T. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de caldo de cana comercializado por ambulantes no município de Bauru/SP, Brasil. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*, v. 19, n. 2, p. 21-28, 2017.
- TACO. Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos/NEPA – UNICAMP (4th ed.). Campinas: *NEPA – UNICAMP*, 161 pp. 2011.
- Taylor, T.M.; Sofos, J.N.; Bodnaruk, P.; Acuff, G.R. *Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis*. In: Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5ª ed. Washington: *American Public Health Association (ALPHA)*, 2015, 13-25 p.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br