

Avaliação Microbiológica em Suco de Laranja *in natura* pelo Sistema Rápido Compact Dry®

Microbiological Evaluation of Fresh Orange Juice by Ready-to-use System Compact Dry®

Aline Teodoro de Paula^a; Sabrina Neves Casarotti^a; Héberly Fernandes Braga^b;

Aline Zago de Grandi^a; Daise Aparecida Rossi^{c*}

^aUniversidade Estadual Paulista, SP, Brasil

^bInstituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro - Campus Ituiutaba, MG, Brasil

^cUniversidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil

* E-mail: daiser@umarama.ufu.br

Recebido: 14 de Outubro de 2010. Aceito: 27 de Dezembro de 2010.

Resumo

O suco de laranja fresco é amplamente consumido, devido ao seu sabor agradável e por representar uma importante fonte de vitamina C, minerais e carboidratos. Essas características tornam o suco um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos, como bolores e leveduras. Técnicas alternativas aos métodos de plaqueamento em ágar para enumeração de microrganismos têm sido desenvolvidas buscando-se rapidez e simplicidade, mas sem comprometimento da sensibilidade e exatidão. O objetivo desse estudo foi avaliar a presença de bolores e leveduras em 16 amostras de sucos de laranja *in natura* comercializados na cidade de Uberlândia-MG e analisar a aplicabilidade do método alternativo Compact Dry® na enumeração destes microrganismos. Das 16 amostras, 93,75% apresentaram contagens iguais ou superiores a 10^4 UFC. mL⁻¹, tanto pelo método tradicional quanto pelo Compact Dry®. O coeficiente de correlação obtido entre os métodos tradicional e Compact Dry® foi de 0,9227. A contagem obtida não mostrou diferença significativa entre os métodos empregados. Os resultados sugerem a aplicabilidade do sistema Compact Dry® como técnica alternativa ao método convencional de plaqueamento.

Palavras-chave: Leveduras. Sucos. Métodos. Microbiologia.

Abstract

Fresh orange juice is a popular source of vitamin C, minerals and carbohydrates. However, for the same reasons, it is a suitable environment for microorganism growth, as yeasts and molds. Alternative techniques to agar plating methods for microorganisms counting have been developed. Due to their many advantages, particularly their convenience of use without producing any effect on analytical sensibility and precision, the popularity of ready-to-use systems for the enumeration of microorganisms is increasing. The aim of the present study was evaluate the presence of yeasts and molds in 16 samples of fresh orange juice and analyze the performance of Compact Dry® YM for counting these microorganisms. Of the 16 collected samples, 93.75% had presented the 10^4 higher or equal counting UFC.mL⁻¹ for both methods. Correlation coefficient of 0,9227 was observed for traditional method and Compact Dry®. The results suggest that Compact Dry® is suitable as an alternative technique to conventional methods for microorganisms counting.

Keywords: Yeasts. Juices. Methods. Microbiology.

1 Introdução

O suco de laranja é um alimento rico em nutrientes e bastante consumido em diferentes partes do mundo. Esse amplo consumo se deve ao baixo custo de produção, aceitabilidade, facilidade de acesso pelo consumidor, assim como ao aumento da conscientização sobre as propriedades nutricionais das frutas e dos sucos naturais. Essas razões contribuem para que se aumente o interesse e a preocupação com a qualidade microbiológica deste alimento¹.

O suco de laranja fresco refrigerado não sofre nenhum tratamento térmico. Após a extração, é envasado em recipiente adequado, no qual deve ser mantido refrigerado (8 a 10 °C), distribuído e comercializado². Como não sofre tratamento térmico, é importante ressaltar que o mesmo possui tempo de prateleira curto, aproximadamente dois dias, e é por esse motivo que seu potencial de comercialização é limitado³.

Entre os fatores que influenciam na condição microbiológica

dos sucos de laranja, pode-se destacar: carga microbiana da superfície externa do fruto; condições higiênico-sanitárias das máquinas extratoras; e ainda, falta de higiene dos vendedores dos sucos e seus hábitos, como manter o produto sem refrigeração, ou colocar os canudos em locais inapropriados⁴.

O suco de laranja apresenta características físico-químicas próprias, como alta acidez e açúcares. Por isso, a deterioração de natureza microbiológica do mesmo limita-se aos microrganismos tolerantes ao meio ácido (pH na faixa de 2,0 a 4,5), com predomínio de bactérias lácticas, leveduras e bolores. Além disso, esses microrganismos podem provocar alterações nos sucos, principalmente se estiverem acondicionados em temperatura ambiente⁵.

A degradação por leveduras é a causa mais comum da deterioração dos sucos de frutas. Esses microrganismos conseguem sobreviver neste ambiente devido à elevada tolerância aos ácidos, às baixas temperaturas, à assimilação de

ácidos orgânicos, tais como o succinato, ácido lático e cítrico. Além disso, desenvolvem-se anaerobicamente e apresentam maior resistência térmica do que as bactérias e a maioria dos fungos. Possuem temperatura ótima de crescimento na faixa de 20 a 30 °C, suportando altas temperaturas (65 a 70 °C). Seu desenvolvimento promove a produção de CO₂ e etanol, mas também pode manifestar a formação de películas e floculação que diminuem a turvação dos sucos. Podem também produzir acetaldeído que contribui para o odor fermentado. O crescimento excessivo de certas leveduras nesses produtos pode levar a formação de gases, sabores e odores desagradáveis, despigmentações, modificações na textura^{6,7}.

Até o final de 2000, a Portaria 451/97-MS estabelecia padrões em relação à contaminação de bolores e leveduras em suco de laranja fresco, preconizando como contagem máxima 10⁴UFC. mL⁻¹. Porém, de acordo com a legislação vigente, na RDC nº12 de 2001 do MS, não existem padrões para esse tipo de contaminação^{8,9}. Apesar de não haver padrões microbiológicos para o suco de laranja *in natura*, sabe-se que suas condições de higiene devem ser bem controladas para não oferecer risco ao consumidor e também para que o mesmo tenha vida útil suficiente para a sua comercialização¹⁰.

A enumeração de bolores e leveduras é um importante aspecto para a avaliação da qualidade microbiológica de alimentos ácidos. Os métodos de plaqueamento em meio seletivo para enumeração destes microrganismos têm sido tradicionalmente utilizados para essa avaliação. No entanto, o tempo envolvido na execução é considerado excessivo pelas empresas e, ainda, podem levar a erros decorrentes de fatores como a não correção de pH e resíduos de produtos de limpeza nas vidrarias. Estas características muitas vezes limitam o número de análises que podem ser realizadas em unidades produtivas¹¹.

Nos últimos anos várias metodologias de análises alternativas têm sido oferecidas às indústrias de alimentos. De forma geral, são consideradas mais rápidas e mais práticas que a metodologia convencional, sem comprometer a sensibilidade e exatidão^{12,13}. O sistema Compact Dry® contém enzimas cromogênicas capazes de detectar atividades de enzimas características dos microrganismos pesquisados¹⁴. O Compact Dry® YM usado para quantificar bolores e leveduras contém ainda antibióticos¹⁵ e foi validado pela A.O.A.C. sob nº. 100401¹⁶.

Existem poucos estudos sobre o desempenho desse sistema em análises envolvendo alimentos com baixo pH, como os sucos de laranja. O estresse microbiano, causado por baixo pH e refrigeração, pode afetar a eficiência do sistema Compact Dry® na enumeração de fungos¹⁷.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de bolores e leveduras em sucos de laranja *in natura* comercializados na cidade de Uberlândia-MG e analisar a aplicabilidade do método alternativo Compact Dry® na enumeração destes microrganismos.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção e preparo das amostras

As análises comparativas foram realizadas em 16 amostras de suco de laranja *in natura* adquiridos aleatoriamente em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Uberlândia – MG, após preparo imediato. As amostras foram coletadas utilizando-se saco plástico estéril, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/FAMEV/UFU), onde foram analisadas. No laboratório, as amostras receberam um número de identificação e suas embalagens foram higienizadas externamente com álcool etílico 70% (v/v), levadas para fluxo laminar e abertas asépticamente. Em seguida, realizaram-se as diluições decimais seriadas em 9 mL de água peptonada 0,1%.

2.2 Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras, em duplicata, foi realizada em paralelo pela técnica de análise convencional e pelo teste rápido Compact Dry®. Como metodologia convencional foi utilizada a contagem em placas no ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico (PDA)¹⁵. As placas de Compact Dry® YM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) foram inoculadas com 1mL das diluições selecionadas, conforme recomendação do fabricante. As placas de ambos os métodos foram incubadas a 25 °C por cinco dias. Ao final do período de incubação as colônias foram contadas e o total foi multiplicado pela recíproca da diluição utilizada. O resultado foi expresso como UFC. mL⁻¹.

2.3 Análise dos resultados

Os diferentes resultados das contagens foram tabulados e transformados em logaritmo de base 10 (log₁₀). A correlação entre os resultados dos diferentes métodos foi avaliada utilizando-se um modelo de regressão linear (MS Excel, Microsoft, USA) e a análise de variância, por meio do teste-t, considerando-se p<0,05 (ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2). A correlação foi classificada, de acordo com o valor do coeficiente de correlação, como “excelente” (1,00 – 0,90), “boa” (0,89 – 0,80) ou “regular” (<0,80).

3 Resultados e Discussão

Dentre as 16 amostras analisadas, 15 (93,75%) apresentaram contagens de bolores e leveduras iguais ou superiores a 10⁴ UFC. mL⁻¹, tanto pelo método tradicional, quanto pelo Compact Dry® YM. As contagens variaram de 1,0 x 10⁴ UFC. mL⁻¹ a 5,7 x 10⁸ UFC.mL⁻¹, para o sistema Compact Dry®, e 3,1 x 10³ UFC.mL⁻¹ a 7,8 x 10⁸ UFC.mL⁻¹, para o método tradicional, sendo que somente uma amostra (6,25%) apresentou contagem inferior a 10⁴ UFC.mL⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1: Bolores e leveduras (UFC. mL⁻¹) em 16 amostras de suco de laranja *in natura* coletadas em na cidade de Uberlândia - MG

Amostra	Compact Dry®		Amostra	Tradicional	
	Compact Dry®	Tradicional		Compact Dry®	Tradicional
1	1,5 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵	9	4,8 x 10 ⁸	7,8 x 10 ⁸
2	2,2 x 10 ⁶	6,6 x 10 ⁶	10	8,9 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁷
3	1,0 x 10 ⁴	3,1 x 10 ³	11	5,7 x 10 ⁸	4,9 x 10 ⁸
4	3,7 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶	12	6,3 x 10 ⁵	7,1 x 10 ⁵
5	1,7 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁸	13	2,1 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁵
6	4,2 x 10 ⁶	6,1 x 10 ⁶	14	1,3 x 10 ⁷	4,9 x 10 ⁷
7	5,6 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶	15	3,3 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁷
8	2,4 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁵	16	4,5 x 10 ⁶	5,0 x 10 ⁶

No presente estudo foi encontrada uma amostra (6,25%) com valor menor que 10⁴ UFC. mL⁻¹, em ambos os métodos utilizados; 6 (37,5%) e 4 (25,0%) amostras com valores entre 10⁴ e 10⁵ UFC.mL⁻¹, para o método Compact Dry® e o método tradicional, respectivamente; 4 (25,0%) e 5 (31,15%) amostras com contagens entre 10⁵ e 10⁶ UFC.mL⁻¹, para o método Compact Dry® e o método tradicional, respectivamente; e 5 (31,15%) e 6 (37,5%) amostras apresentaram valores superiores a 10⁶ UFC.mL⁻¹, para o método Compact Dry® e o método tradicional, respectivamente conforme tabela 2.

Tabela 2: Percentual de amostras de suco de laranja *in natura* agrupadas por intervalos de contagem de bolores e leveduras (UFC. mL⁻¹) nos métodos tradicional e Compact Dry®

Intervalo de contagem (UFC. mL ⁻¹)	Método de análise (n°) / %	
	Compact Dry®	Tradicional
< 1,0 x 10 ⁴	(0) 0 %	(1) 6,25 %
1,0 x 10 ⁴ - 10 ⁵	(1) 6,25 %	(0) 0 %
10 ⁵ - 10 ⁶	(6) 37,5%	(4) 25,0%
10 ⁶ - 10 ⁷	(4) 25,0%	(5) 31,15%
>10 ⁶	(5) 31,15%	(6) 37,5%

Neste estudo, 50,0 e 68,75% das amostras analisadas tiveram contagens superiores a 10⁵ UFC. mL⁻¹ para o método Compact Dry® e o método tradicional, respectivamente. Não existe padrão pré-estabelecido para contagem máxima aceitável de bolores e leveduras em suco de laranja na RDC n°12 de 2001 do MS⁹.

Um estudo realizado nos Estados Unidos relatou 21 surtos causados pelo consumo de sucos de frutas, entre 1995 e 2005. Desse total, 2 estavam relacionados à presença de *Cryptosporidium parvum*¹⁸.

Foram analisadas¹⁹, no Rio de Janeiro, 50 amostras de sucos de laranja *in natura* obtidas em estabelecimentos comerciais e dentre essas 41,7% estavam contaminadas por bolores e leveduras, com contagens entre 10⁴ e 10⁵ UFC. mL⁻¹. Altas contagens de bolores e leveduras foram encontradas em sucos de laranja *in natura* comercializadas em Porto Alegre - RS com 44,23% (23) das amostras analisadas apresentando padrões acima daqueles estabelecido pela portaria 451/97 - MS⁴. Resultados semelhantes foram observados por Tournas

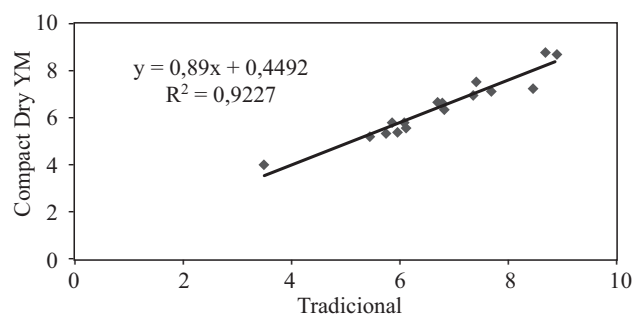
et al.²⁰ em 35 sucos de laranja pasteurizados dos quais 23% (8) apresentaram contagens de bolores e leveduras que variaram entre 1,0 a 10⁶ UFC.mL⁻¹.

Souza et al.⁶ encontraram em sucos de laranja *in natura* não pasteurizados, armazenados em condições isotérmicas e não-isotérmicas, contagens de bolores e leveduras que variaram entre 10³ e 10⁴ UFC.mL⁻¹.

Os resultados obtidos para a contaminação de bolores e leveduras sugerem problemas relacionados com a limpeza das cascas das laranjas antes de serem espremidas ou higienização inadequada do maquinário das extratoras¹⁰. A contaminação por esses tipos de microrganismos não envolve demasiados riscos à saúde humana, uma vez que sucos de laranja não são meios ideais para a produção de micotoxinas²¹. Contudo Scheidegger et al.²² sugerem precaução, já que esses produtos podem causar severas infecções por *Candida albicans* em pessoas imuno-deprimidas.

Além disso, diversos autores demonstraram que a contaminação por diferentes tipos de fungos, mesmo sob refrigeração, provoca acúmulo de biomassa, redução da quantidade de açúcares e, conseqüentemente, redução da vida-de-prateleira de sucos de laranja^{21,23,24}.

A correlação entre os resultados obtidos nos métodos de análises utilizados foi positiva e significativa (r²=0,9227). Esse coeficiente indica que os dois métodos são equivalentes, e que o Compact Dry® representa uma alternativa para análise deste grupo de microrganismos em suco de laranja *in natura*. A representação gráfica com o coeficiente de correlação e a equação da reta entre os diferentes métodos pode ser observada na figura 1.

**Figura 1:** Regressão linear das contagens de bolores e leveduras pelo sistema rápido Compact Dry® YM e pelo método tradicional em 16 amostras de suco de laranja *in natura*

Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes a outras comparações que demonstraram coeficientes de correlação positivos e significativos entre a metodologia tradicional e o Compact Dry® YM^{14,15,25,26}. O teste-t indicou que não houve diferença significativa (p>0,05) entre os métodos utilizados.

4 Conclusão

A presença de bolores e leveduras nas amostras analisadas, provavelmente não representam riscos à saúde humana considerando que sucos de laranja não são meios ideais para produção de micotoxinas. Não houve diferença significativa entre os dois métodos segundo o teste-t e o coeficiente de correlação foi positivo ($r^2=0,9227$). O sistema Compact Dry® YM mostrou-se equivalente ao método tradicional de contagem de bolores e leveduras, representando uma alternativa para essa análise em suco de laranja *in natura*.

Referências

1. Silva PT, Fialho E, Miguel MAL, Lopes MAM, Valente-Mesquita VL. Estabilidades química, físico-química e microbiológica de suco de laranja cv. “Pera” submetido a diferentes condições de estocagem. *Bol Centro Pesqui Process Aliment* 2007;25(2):235-46.
2. Almeida RB, Guimarães RP, Castro RES, Bernardi MRV, Soares M, Araújo KGL. Estudo da qualidade microbiológica, físico-química e sensorial de suco de laranja fresco envasado em garrafas plásticas. *Hig Aliment* 2003;17(108):68-72.
3. Hoffmann FL, Bueno SM, Vinturim, TM. Qualidade microbiológica de sucos de frutas “*in natura*”. *Hig Aliment* 2001;15(80-81):59-62.
4. Ruschel CK, Carvalho HH, Souza RB, Tondo EC. Qualidade microbiológica e físico-química de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS. *Cienc Tecnol Aliment* 2001;21(1):94-7.
5. Venturini Filho WG. Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado. Botucatu: Edgard Blüchen; 2005.
6. Souza MCC, Benassi MT, Meneghel RFA, Silva RSSF. Stability of unpasteurized and refrigerated orange juice. *Braz Arch Biol Technol* 2004;47(3):391-7.
7. Álvarez-Martín P, Flórez AB, Hernández-Barranco A, Mayo B. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control* 2008;19(1):62-70.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil* 1997(82):21005-11.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil* 2001
10. Iha MH, Favaro RMD, Okada MM, Prado SPT, Bergamini AMM, Oliveira MA, Garrido NS. Avaliação físico-química e higiênico-sanitária do suco de laranja fresco engarrafado e do suco pasteurizado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2000;59(1):39-44.
11. Barancelli GV, Sarkis F, Gallo CR, Oliveira AJ. Avaliação de métodos para enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes em leite cru. *Hig Aliment* 2004;18(120):70-84.
12. Franco BDMG. Métodos rápidos de análises microbiológicas de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias. São Paulo: USP; 1994.
13. Casarotti SN, Paula AT, Rossi DA. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. *Ver Inst Adolfo Lutz* 2007;66(3):278-86.
14. Dualdo LCS, Casarotti SN, Paula AT, Melo RT, Rossi DA. Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema Compact Dry® TC durante estocagem refrigerada de iogurtes. *Rev Inst Latic Cândido Tostes* 2010;374(65):1-10.
15. Silva N, Junqueira VCA., Silveira NFA. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. São Paulo: Livraria Varela; 2001.
16. AOAC. Research Institute. Certificate of *performance tested*™ status (Certificate no. 100401) - Nissui Compact Dry Yeast and Mould, Washington; 2009.
17. Ferrati AR, Tavolaro P, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. A comparison of ready-to-use systems for evaluating the microbiological quality of acid fruit juices using non-pasteurized orange juice as an experimental model. *Int Microbiol* 2005;8(1):49-53.
18. Vojdani JD, Beuchat LR, Tauxe RV. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *J Food Protect* 2008;71(2):356-64.
19. Oliveira JC, Setti-Perdigão P, Siqueira KAG, Santos AC, Miguel MAL. Características microbiológicas do suco de laranja *in natura*. *Cienc Tecnol Aliment* 2006;26(2):241-5.
20. Tournas VH, Heeres J, Burgess L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiol* 2006;23(7):684-8.
21. Wyatt MK, Parish ME, Widmer WW, Kimbrough J. Characterization of mould growth in orange juice. *Food Microbiol* 1995;12:347-55.
22. Sheidegger C, Pietrzak J, Frei, R. Methadone diluted with contaminated orange juice or raspberry syrup as a potential source of disseminated candidiasis in drug abusers. *European J Clin Microbiol Infect Disease* 1993;12(3):229-31.
23. Cancelon PF, Parish ME. Changes in the chemical composition of orange juice during growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Gluconobacter oxydans*. *Food Microbiol* 1995;12:117-24.
24. Beuchat LR. Spoilage of acid products by heat-resistant molds. *Dairy Food Environm Sanitation* 1998;18(9):588-93.
25. Kodaka H, Mizuochi S, Teramura H, Nirazuka T, Oda S, Tanaka H, Richter ER, Betts R. Comparison of the Compact Dry YM with the FDA BAM Method for Enumeration of Yeasts and Molds in Fruit-Based Products: Performance-Tested MethodSM 100401. *J AOAC Int* 2006;9(1):127-38.
26. Beuchat LR, Mann DA, Gurtler JB. Comparison of dry sheet media and conventional agar media methods for enumerating yeasts and molds in food. *J Food Protect* 2007;70(11):2661-4.