

Capítulo 16

Avaliação da microbiota e sanitização de esponjas utilizadas em unidades de alimentação de Montes Claros, MG

Alécia Daila Barros Guimarães^{*1}; Larissa Lorrane Rodrigues Borges²; Klinger Vinícius de Almeida³; Roberta Torres Careli⁴

Resumo

As esponjas utilizadas em unidades de alimentação podem ser veículo de contaminação cruzada por transferirem microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes de superfícies de utensílios para os alimentos. Objetivou-se avaliar a eficiência de procedimentos de sanitização de esponjas utilizadas na higienização de utensílios e equipamentos de estabelecimentos comerciais de alimentação, analisar a microbiota presente e identificar *Escherichia coli* nas esponjas analisadas. As esponjas naturalmente contaminadas foram submetidas à quantificação de microrganismos presentes e a tratamentos de fervura por 5 min, hipoclorito de sódio 200 mg.L⁻¹ e hipoclorito de sódio submetido a sonicação por 20 min. A avaliação de presença e sobrevivência de microrganismos foi realizada quanto à contagem de bactérias mesófilas aeróbias (MA), coliformes a 45 °C (CF) e fungos filamentosos e leveduras (FL). Todas as amostras apresentaram contaminação inicial por MA, CF e FL. Uma das amostras estava contaminada por *Escherichia coli*, a qual foi identificada por análise proteômica com 99,9% de similaridade. Fervura foi o procedimento mais eficiente na redução da contagem inicial dos microrganismos avaliados, por isso, foi o procedimento recomendado para a higienização das esponjas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Contaminação cruzada. Desinfecção química. Desinfecção física.

Introdução

As doenças veiculadas por alimentos ainda continuam frequentes, podendo apresentar um elevado risco a saúde do consumidor. Um dos fatores mais importantes que podem contribuir para o

¹ Graduanda em Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

² Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

³ Mestrando em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

⁴ Professor Associado, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

*aleciabarros@live.com

aumento dessas doenças em serviços de alimentação é a contaminação cruzada. Este termo é utilizado para referir-se à transferência de microrganismos de alimentos contaminados para outro alimento, através de superfícies ou utensílios contaminados (ICMSF, 2015). Essa contaminação pode ser oriunda de manipuladores, ambiente de produção, equipamentos, móveis e utensílios (GREIG; RAVEL, 2009).

As esponjas utilizadas na limpeza de superfícies e utensílios possuem condições que favorecem o crescimento de microrganismos, pois apresentam pequenos orifícios que facilitam a retenção de restos alimentares e umidade. Devido a essas condições, as esponjas podem ser veículo de contaminação cruzada por transferirem microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes de superfícies para os alimentos (ROSSI *et al.*, 2012).

As esponjas podem estar contaminadas por algumas espécies bacterianas patogênicas como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. Esses patógenos podem permanecer nas superfícies por horas ou dias após a contaminação, podendo contaminar os alimentos e provocar surtos alimentares (KUSUMANINGRUM *et al.*, 2003). Por esses motivos, métodos de desinfecção de esponjas utilizadas em unidades de alimentação, devem ser adotados a fim de diminuir a contaminação microbiológica e reduzir o risco de contaminação cruzada (ROSSI *et al.*, 2012).

Escherichia coli é um bastonete Gram-negativo, anaeróbico facultativo, pertence à família Enterobacteriaceae, mesófilo capaz de se desenvolver entre 7 e 46 °C, tendo temperatura ótima de 37° C. É uma espécie patogênica muito comum em surtos alimentares (ICMSF, 2015).

Com isso, esta pesquisa objetivou avaliar a eficiência de procedimentos físicos e químicos de sanitização de esponjas utilizadas na higienização de utensílios e equipamentos de estabelecimentos comerciais de alimentação localizados na cidade de Montes Claros, MG. Além disso, objetivou analisar a microbiota presente e identificar *Escherichia coli* nas esponjas analisadas.

Material e métodos

Foram coletadas 20 esponjas de poliuretano em unidades de alimentação na cidade de Montes Claros – MG, tais como: restaurantes, bares, lanchonetes e padarias, com tempos de utilização diferentes. As esponjas foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados e transportadas a 6 °C ± 2 °C, em caixas de isopor, para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

As esponjas (110 mm x 75 mm x 15 mm) foram cortadas assepticamente em quatro partes iguais para aplicação dos seguintes tratamentos: (a) fervura por 5 min em 200 mL de água destilada

esterilizada; (b) imersão em 200 mL de solução de hipoclorito de sódio a 200 mg/L por 20 min, e (c) imersão em 200 mL de solução de hipoclorito 200 mg/L submetido à sonicação (QUIMIS®, Q335D) por 20 min. Os procedimentos (b) e (c) foram realizados a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a neutralização do hipoclorito de sódio, as amostras foram imersas em tiosulfato de sódio a 0,25 % por 20 min. Para verificar a contaminação microbiológica inicial de cada esponja, a parte restante foi analisada sem nenhum tipo de tratamento.

A microbiota das amostras foi analisada quanto à presença de bactérias mesófilas aeróbias (MA), fungos filamentosos e leveduras (FL) e coliformes a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme metodologias descritas por Evancho *et al.* (2001). Os resultados foram expressos em log UFC/esponja.

Após as análises das esponjas quanto à presença de coliformes a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, os tubos contendo caldo *Escherichia coli* (HIMEDIA®, Mumbai, Índia) considerados positivos, ou seja, aqueles que apresentaram turvação e produção de gás após 24 h foram utilizados para o isolamento da espécie *E. coli*. O isolamento consistiu na retirada de uma alçada das amostras presentes nesses tubos, seguido de esgotamento em placas com Ágar Eosina Azul de Metileno (HIMEDIA®, Mumbai, Índia) pela técnica de estriamento. Estas placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, com posterior observação do desenvolvimento de colônias nucleadas com centro preto com brilho metálico, típicas de *E. coli*. Cinco colônias típicas foram selecionadas e incubadas em tubos de ensaio contendo meio Rugai Modificado para triagem bioquímica presuntiva inicial conforme metodologias descritas por Pessoa e Silva (1972). O procedimento consistiu na inoculação de uma colônia típica com o auxílio de alça bacteriológica. A alça foi introduzida até a parte inferior do tubo e ao retirá-la, semeou-se a superfície do meio realizando estria simples. As colônias bioquimicamente compatíveis com *E. coli* foram submetidas à análise molecular.

Para identificação de cepas isoladas realizou-se análise proteômica seguindo o protocolo de extração padrão adaptado de Freiwald e Sauer (2009). Uma alçada de cultura bacteriana pura foi ressuspensa em 1,2 mL de solução de etanol 75 %. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi removido. Foi adicionado 50 μL de acetronitrila, ácido 11 fórmico e água (50:35:15 v/v) ao pellet formado, o qual sofreu agitação em vortéx durante 1 min para extração de células. Foi realizada uma segunda centrifugação e 0,3 μL de sobrenadante foi depositado em uma placa com três poços e este foi seco em temperatura ambiente. Adicionou-se 0,3 μL de uma solução saturada de alpha-ciano-4-ácido-hidroxicianídrico, acetronitrila, água e ácido trifluoroacético TFA (50:47:5:2,5 v/v). A análise por Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight – mass spectroscopy (MALDI-TOF MS) foi realizada segundo Dusková *et al.* (2012), utilizando Microflex TM MALDI-TOF MS (BrukerDaltonics, Billerica, Massachusetts, EUA). As identificações foram expressas por BioTyper

Log (scores), indicando a similaridade da cepa desconhecida por MALDI TOF MS com o perfil disponível em bancos de dados.

O experimento foi conduzido segundo um Delineamento Inteiramente Casualizado com vinte repetições, sendo cada esponja equivalente a uma repetição. Realizou-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando a significância de 5% no programa estatístico SISVAR (2011).

Resultados e discussão

As esponjas analisadas apresentaram contaminação média inicial por MA de 6,72 log UFC/esponja (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Kusumaningrum *et al.* (2002). Esses autores encontraram contagens de MA de 6,00 log UFC/esponja em esponjas usadas em cozinhas na Holanda. Com o emprego dos tratamentos, houve redução desta carga microbiana inicial. Em esponjas submetidas à solução de hipoclorito de sódio a 200 mg/L, observou-se uma contagem média de MA de 5,59 log UFC/esponja, e à hipoclorito de sódio a 200 mg/L associado à sonicação, a contagem média foi 5,36 log UFC/esponja. Verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre esses dois tratamentos químicos (Tabela 1). No tratamento com fervura, a contagem média de MA obtida foi de 2,36 log UFC/esponja, com redução de 4,36 log UFC/esponja em relação à contaminação encontrada sem nenhum tipo de tratamento. Observou-se que a aplicação de fervura foi o procedimento mais eficiente ($p > 0,05$) na redução da contaminação por MA (Tabela 1).

Na análise de FL, a contagem inicial obtida foi 6,11 log UFC/esponja (Tabela 1). Não foi observada eficiência na aplicação dos tratamentos com hipoclorito 200 mg.L⁻¹ e hipoclorito 200 mg.L⁻¹ com sonicação quando comparados à contagem inicial de FL ($p > 0,05$). Contudo, após o processo de fervura, obteve-se uma redução média significativa ($p < 0,05$) com contagem média de FL de 3,67 log de UFC/esponja (Tabela 1).

Todas as esponjas analisadas apresentaram contaminação por Coliformes a 45 °C. A contaminação inicial encontrada foi 3,58 log UFC/esponja. Esse resultado foi similar ao encontrado por Ojima *et al.* (2002), os quais reportaram que a maior parte das esponjas coletadas no Japão, apresentaram contaminação por coliformes. Houve redução da carga microbiana inicial após a aplicação dos tratamentos com hipoclorito de sódio 200 mg.L⁻¹ associado a sonicação e fervura (Tabela 1), com contagens de 2,80 e 0,47 log UFC/esponja ($p < 0,05$), respectivamente. Entretanto, o tratamento com hipoclorito de sódio 200 mg.L⁻¹ não foi eficiente na redução da carga de Coliformes a 45 °C com

contagem de 3,04 log UFC/esponja ($p > 0.05$). Dos procedimentos utilizados, observou-se que a fervura foi o procedimento que mais reduziu ($p < 0,05$) a carga de coliformes nas esponjas (Tabela 1).

Tabela 1 – Contagens de microrganismos, expressas em log UFC/esponja, em amostras de esponjas coletadas em unidades de alimentação, antes e após tratamentos químicos e físicos de sanitização

Microrganismos (Log UFC/esponja)	Tratamentos			
	Controle	Hipoclorito de sódio 200 mg.L ⁻¹	Hipoclorito de sódio 200 mg.L ⁻¹ e sonicação	Fervura
Mesófilos aeróbios	6,72 ^a ± 1,06	5,59 ^b ± 0,95	5,36 ^b ± 1,35	2,36 ^c ± 0,89
Fungos filamentosos e leveduras	6,11 ^a ± 1,23	5,46 ^a ± 1,24	5,31 ^a ± 1,13	2,44 ^b ± 0,77
Coliformes a 45 °C	3,58 ^a ± 1,07	3,04 ^{ab} ± 0,85	2,80 ^b ± 0,67	0,47 ^c ± 0,00

Fonte: Dos Autores 2019.

Nota: Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Dentre os procedimentos de sanitização utilizados, constatou-se que o método físico de fervura foi o mais eficiente na redução de MA, FL e CF, presentes na microbiota das esponjas. Esses resultados corroboram com os encontrados por Rossi *et al.* (2012).

Apesar de não existirem padrões microbiológicos para esponjas, a Portaria 78/2009, publicada pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2009) afirma que esponjas de limpeza quando utilizadas em superfícies que entram em contato com alimentos, devem ser sanitizadas diariamente, por fervura em água, por no mínimo 5 min ou outro método adequado. Contudo, não foi divulgado nenhum embasamento científico desse procedimento.

Após resultados de Coliformes a 45 °C positivos para a triagem bioquímica, constatou-se que uma cepa isolada em estudo foi identificada por análise proteômica como *Escherichia coli* com 99,9% de similaridade com o perfil disponível no banco de dados. A presença dessa espécie é preocupante,

visto que, a identificação de *E. coli* em um utensílio utilizado em unidades de alimentação pode ocasionar contaminação cruzada por uma bactéria patogênica.

Conclusão

A fervura foi o procedimento mais eficiente de sanitização por ter provocado redução de todos os microrganismos avaliados nas esponjas. A microbiota das esponjas foi composta de MA e FL com concentrações acima de 6,00 log UFC/esponja. Além disso, o grupo coliforme a 45 °C estava presente nestes utensílios de limpeza e foi possível identificar um isolado de *E. coli*. A presença desta espécie em esponjas é preocupante, visto que é um microrganismo patogênico envolvido em surtos alimentares e pode ser transferido para outros utensílios durante a higienização dos mesmos. Dessa forma, faz-se necessário a fervura de esponjas utilizadas nas unidades de alimentação.

Referências

- BRASIL, Portaria n. 78 de 28 de janeiro de 2009 da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, Aprova as Normas Para os Cursos de Capacitação em Boas Práticas Para Serviços de Alimentação e dá Outras Providências. **Diário Oficial da União**, Porto Alegre, RS, 2009.
- DUSKOVÁ, M.; *et al.* Identification of *lactobacilli* isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. **Int. J. Food Microbiology**, v. 159, p. 107–114, 2012.
- EVANCHO, G. M. *et al.* Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In: DOWNES, F. P., ITO, K. (Ed). **Compendium methode for the microbiological examination of foods**. 4thed Washington: APHA, 2001. cap. 3, p. 25-35.
- FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, p. 732-742, 2009.
- GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 77-87, 2009.
- ICMSF. **Microrganismos em alimentos 8**: utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação de produto. São Paulo: Blucher, 2015. 536 p.
- KUSUMANINGRUM, H. D. *et al.* Effects of dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. **Journal of food protection**, v.65, n.1, p. 61-65, 2002.
- KUSUMANINGRUM, H. D. *et al.* Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**. v. 25, n. 3, p. 227-236, 2003.
- OJIMA, M. *et al.* Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in japanese households, **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 800-809, 2002.
- PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 32, p. 97-100, 1972.