

AValiação DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE AMOSTRAS DE AÇÚCAR REFINADO DE DIFERENTES MARCAS COMERCIAIS OBTIDAS NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

FERNANDO LEITE HOFFMANN\*  
CRISPIN HUMBERTO GARCIA CRUZ\*  
TÂNIA MARIA VINTURIM\*

Realizou-se análises microbiológicas em dez marcas diferentes de açúcar refinado obtidas em bares, supermercados e usinas da região de São José do Rio Preto - SP. Foi pesquisada a presença de bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras, bactérias tipo "flat-sour" e bactérias de deterioração sulfídrica. Os resultados obtidos indicaram que as amostras situavam-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Com relação à bactérias produtoras de deterioração acidez plana, somente uma amostra (10%) apresentou-se em desacordo com o padrão internacional proposto. Quanto às bactérias de deterioração sulfídrica, todas as amostras analisadas (100%) apresentaram-se fora do padrão internacional estabelecido de 5 esporos/10 g de produto.

## 1 INTRODUÇÃO

O açúcar refinado utilizado no processamento de diferentes produtos açucarados é definido como a sacarose obtida do caldo de cana purificada por processo tecnológico adequado (17).

Quando o açúcar está contaminado pode contribuir grandemente na elevação da população de microrganismos presente nos produtos finais, antes de sua esterilização ou de qualquer tratamento térmico (10, 11). Tal fato levou ao estabelecimento de limites máximos de contaminação microbiológica permitidos por alguns órgãos oficiais (10). No Brasil a legislação vigente apresenta somente padrões para Salmonella (ausência em 25 g) e bolores e leveduras, no máximo de  $10^3$ /g (2). Não existindo portanto, padrão microbiológico para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas,

\* Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista.

bactérias tipo "flat-sour" e bactérias de deterioração sulfídrica na atual legislação (2). Entretanto, para bactérias de deterioração sulfídrica (Desulfotomaculum nigrificans) existe o padrão internacional proposto de 5 esporos/10 g de produto (5,10).

Na indústria açucareira, a presença de elevado número de microrganismos, durante e após o processamento, pode ocasionar perda considerável no rendimento obtido (5). Além disso, esta perda de açúcar pode ocorrer durante o armazenamento se as condições forem favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos (5).

Alguns microrganismos podem desenvolver-se durante a extração e/ou refino, podendo até mesmo contaminar o produto depois do processamento. Normalmente eles são inferiores a  $10^2$ /g, porém quando presentes em número suficiente (no açúcar já refinado) podem causar sérias deteriorações em alimentos que contenham açúcar como ingrediente (9). Dentre esses microrganismos estão o Bacillus stearothermophilus e Bacillus coagulans, produtores de deterioração "flat-sour"; Clostridium thermosaccharolyticum, produtor de ácido e causador de estufamento em alimentos enlatados; D. nigrificans, que ocasiona deterioração sulfídrica, e ainda, bactérias mesófilas, leveduras e bolores (10).

O açúcar, além de seu uso mais comum como adoçante, é também a matéria-prima principal utilizada na elaboração de diversas sobremesas como compotas, geléias, pudins e outros produtos adocicados, que posteriormente podem apresentar deterioração. Tendo em vista as considerações acima, este trabalho teve como objetivo avaliar as características microbiológicas de dez marcas diferentes de açúcar refinado, obtidas em estabelecimentos comerciais (bares, supermercados e usinas) da região de São José do Rio Preto - SP, através da realização das seguintes análises microbiológicas: contagem de bactérias aeróbias mesófilas, de bolores e leveduras, de bactérias do tipo "flat-sour" e de bactérias de deterioração sulfídrica.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das amostras

Foram obtidas dez amostras de diferentes marcas de açúcar refinado em estabelecimentos comerciais (supermercados, bares e usinas) da região de São José do Rio Preto - SP. As amostras coletadas nas usinas, foram colocadas em frascos de vidro estéreis e hermeticamente fechados; tanto essas, quanto as obtidas no comércio foram conduzidas de imediato ao laboratório, para a realização das análises.

### 2.2 Preparo das amostras

Foram pesadas 20 g de cada uma das dez amostras diferentes de açúcar refinado em erlenmeyer estéril de 150 ml de capacidade. Adicionou-se, em seguida, 100 ml de água destilada estéril e procedeu-se agitação até a completa dissolução da amostra. Nas inoculações foram utilizadas alíquotas de 2 ml, exceto quando especificado (1,6,9,13).

### 2.3 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

O ágar padrão para contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi inoculado numa série de 5 placas de Petri, seguido de incubação a 32°C durante 72 horas. As colônias das 5 placas foram contadas e o total multiplicado por 5. Dessa forma o resultado total foi expresso em UFC/10 g de produto, uma vez que em cada placa havia 0,2 g do produto (1,9).

### 2.4 Contagem de bolores e leveduras

O ágar batata dextrose acidificado para a enumeração de bolores e leveduras foi inoculado em outra série de placas de Petri, seguido de incubação a 32°C durante 5 dias. As colônias foram contadas e o resultado também expresso em UFC/10 g de produto (1,9).

### 2.5 Contagem de bactérias do tipo "flat-sour" (acidez plana)

A diluição inicialmente preparada no item 2.2 foi submetida a choque térmico (ebulição por 5 minutos). A seguir distribuiu-se 2 ml em cada uma das 5 placas de Petri e colocou-se o ágar dextrose triptona adicionado de púrpura de bromocresol (indicador). As placas foram incubadas a 55°C durante 48 horas. Posteriormente foram contadas todas as colônias com auréola amarela presentes nas 5 placas, cujo total foi multiplicado por 5 para o resultado ser dado como número de esporos de "flat-sour" por 10 g de produto (1, 22).

### 2.6 Contagem de bactérias de deterioração sulfídrica

Para a determinação desses esporulados anaeróbios termófilos produtores de ácido sulfídrico, foram distribuídos 20 ml da diluição inicial (item 2.2), submetida a choque térmico, em 6 tubos de ensaio contendo ágar sulfito previamente exaustado. Os tubos de ensaio, foram selados com vaspar e incubados em anaerobiose a 55°C durante 48 horas. As colônias pretas, que cresceram nos 6 tubos, foram contadas e o total multiplicado por 2,5. O resultado foi apresentado como número de esporos por 10 g de produto (1, 4, 16, 20).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises efetuadas em 10 diferentes amostras de açúcar refinado, estão expressos na Tabela 1.

Apesar da legislação brasileira não apresentar padrão para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas em açúcar refinado, a mesma foi realizada com o objetivo de se estimar a vida útil do produto, uma vez que maior número de microrganismos poderia diminuir a vida de prateleira do mesmo (21).

Pela Tabela 1 pode-se observar que nas primeiras 24 horas de incubação os resultados apresentados pelas amostras foram, em ordem decrescente, os seguintes: amostra 5>1>10>2>9>8>6>3>7>4. Em 48 horas de incubação os resultados foram: amostra 5>1>10>2>6>8 e 9>3>7>4. Ao término do período de incubação (72 horas) os resultados foram: amostra 5>1>10>2>6>8>9>3>7>4. De maneira geral,



### 2.3 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

O ágar padrão para contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi inoculado numa série de 5 placas de Petri, seguido de incubação a 32°C durante 72 horas. As colônias das 5 placas foram contadas e o total multiplicado por 5. Dessa forma o resultado total foi expresso em UFC/10 g de produto, uma vez que em cada placa havia 0,2 g do produto (1,9).

### 2.4 Contagem de bolores e leveduras

O ágar batata dextrose acidificado para a enumeração de bolores e leveduras foi inoculado em outra série de placas de Petri, seguido de incubação a 32°C durante 5 dias. As colônias foram contadas e o resultado também expresso em UFC/10 g de produto (1,9).

### 2.5 Contagem de bactérias do tipo "flat-sour" (acidez plana)

A diluição inicialmente preparada no item 2.2 foi submetida a choque térmico (ebulição por 5 minutos). A seguir distribuiu-se 2 ml em cada uma das 5 placas de Petri e colocou-se o ágar dextrose triptona adicionado de púrpura de bromocresol (indicador). As placas foram incubadas a 55°C durante 48 horas. Posteriormente foram contadas todas as colônias com auréola amarela presentes nas 5 placas, cujo total foi multiplicado por 5 para o resultado ser dado como número de esporos de "flat-sour" por 10 g de produto (1, 22).

### 2.6 Contagem de bactérias de deterioração sulfídrica

Para a determinação desses esporulados anaeróbios termófilos produtores de ácido sulfídrico, foram distribuídos 20 ml da diluição inicial (item 2.2), submetida a choque térmico, em 6 tubos de ensaio contendo ágar sulfito previamente exaustado. Os tubos de ensaio, foram selados com vaspar e incubados em anaerobiose a 55°C durante 48 horas. As colônias pretas, que cresceram nos 6 tubos, foram contadas e o total multiplicado por 2,5. O resultado foi apresentado como número de esporos por 10 g de produto (1, 4, 16, 20).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises efetuadas em 10 diferentes amostras de açúcar refinado, estão expressos na Tabela 1.

Apesar da legislação brasileira não apresentar padrão para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas em açúcar refinado, a mesma foi realizada com o objetivo de se estimar a vida útil do produto, uma vez que maior número de microrganismos poderia diminuir a vida de prateleira do mesmo (21).

Pela Tabela 1 pode-se observar que nas primeiras 24 horas de incubação os resultados apresentados pelas amostras foram, em ordem decrescente, os seguintes: amostra 5>1>10>2>9>8>6>3>7>4. Em 48 horas de incubação os resultados foram: amostra 5>1>10>2>6>8 e 9>3>7>4. Ao término do período de incubação (72 horas) os resultados foram: amostra 5>1>10>2>6>8>9>3>7>4. De maneira geral,

TABELA 1 - RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS EM 10 MARCAS DE AÇÚCAR REFINADO OBTIDAS EM BARES, SUPERMERCADOS E USINAS DA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

AMOSTRA	BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFÍLAS (UFC/10 g)			BOLORES E LEVEDURAS (UFC/10 g)			BACTÉRIAS TIPO "FAL-500R" (esporos/10 g)			BACTÉRIAS DE DEGRADAÇÃO SULFIDRICA (esporos/10 g)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	5 dias	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1	1050	1215	1255	245	360	370	-	-	-	-	-	10
2	305	435	465	25	25	30	-	-	-	-	-	62,5
3	100	215	230	45	55	65	-	-	-	-	-	25
4	5	15	25	10	10	20	-	-	-	-	-	32,5
5	3200	3365	3375	430	970	1290	25	430	-	-	-	45
6	160	280	285	10	20	25	5	10	-	-	-	45
7	75	160	190	-	70	90	-	40	-	-	-	52,5
8	170	240	245	60	85	105	-	5	-	-	-	42,5
9	200	240	240	35	50	50	5	10	-	-	-	55
10	330	460	490	110	195	250	30	40	-	-	-	72,5
PARÂMETRO DIMAL (2)	máximo 10 <sup>3</sup> /g											
ADUBO PROPOSTO (5, 10)												
5/10 g												

os resultados das leituras foram aumentando conforme os tempos de incubação, sendo que a amostra 9 permaneceu constante entre 48 e 72 horas. Desta forma, pode-se supor menor vida útil para a amostra 5 e maior para a amostra 4 desde que armazenadas sob as mesmas condições.

A contagem de bolores e leveduras, nas primeiras 24 horas de incubação apresentou-se da seguinte maneira: 5>1>10>8>3>9>2>4 e 6>7. Em 48 horas: 5>1>10>8>7>3>9>2>6>4 e ao término do período de incubação (5 dias): 5>1>10>8>7>3>9>2>6>4. Pode-se observar que os resultados das leituras, no decorrer da incubação, aumentaram (Tabela 1). Este aumento entretanto, não ocorreu com as amostras 2 e 4 durante a incubação de 24 e 48 horas, o qual só ocorreu de 48 horas para 5 dias. Já a amostra 9 aumentou de 24 para 48 horas, não havendo aumento de 48 horas para 5 dias.

Mesmo com a presença de bolores e leveduras, todas as amostras analisadas enquadraram-se dentro dos limites fixados pela legislação brasileira, que estabelece como padrão um máximo de  $10^3$ /g (2).

A contagem de bactérias produtoras de deterioração tipo "flat-sour", foi a seguinte nas primeiras 24 horas de incubação (preliminar): 10>5>6 e 9>1,2,3,4,7 e 8. Ao término da incubação (48 horas) a contagem foi de: 5>7 e 10>6 e 9>8>1,2,3 e 4. Apesar da legislação brasileira não fazer referência a esses tipos de microrganismos, pode-se verificar que a amostra que poderia apresentar com maior facilidade deterioração tipo acidez plana, seria a amostra 5 que apresentou a maior contagem (430 esporos/10 g de produto). Verifica-se ainda que de 24 para 48 horas de incubação ocorreu aumento na contagem de bactérias "flat-sour" nas amostras 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Em açúcar, de cana ou beterraba, a presença de microrganismos esporulados é comum, uma vez que esses são resistentes às condições de processamento e refino do açúcar.

Podem ser encontrados 3 grupos distintos de bactérias esporuladas termófilas que são importantes agentes de deterioração em açúcar, ou ainda, em produtos onde o mesmo tenha sido utilizado como matéria-prima. *Bacillus stearothermophilus*, causador de deterioração do tipo acidez plana, *Clostridium thermosaccharolyticum*, anaeróbio termófilo não produtor de ácido sulfídrico e *Desulfotomaculum nigrificans*, microrganismo anaeróbio termófilo produtor de ácido sulfídrico. Estas bactérias não tem significância em Saúde Pública, porém número excessivo desses microrganismos podem sobreviver a processos térmicos ocasionando a deterioração em alimentos enlatados pouco ácidos (7, 19). Durante a análise de 91 amostras de açúcar de cana e beterraba, foi verificada a presença dos três principais grupos de microrganismos deteriorantes (5).

O padrão microbiológico para bactérias "flat-sour" estabelecido por CLARK & TANNER, autores do trabalho acima mencionado foi de não mais que 75 esporos/10 g de açúcar, considerando 5 amostras analisadas e na média não mais que 50 esporos/10 g (5). De acordo com esse padrão (proposto), das 91 amostras analisadas 19 (20%) não se enquadrariam como amostras satisfatórias (5). No presente estudo apenas 1 amostra (10%) apresentou-se em desacordo com esse padrão (amostra 5).



De acordo com o ICMSF (10) as perdas de produtos industrializados por deterioração sulfídrica chegaram a apresentar taxas que variaram de 25 a 55%, trazendo como resultado, substancial prejuízo às indústrias envolvidas; uma vez que alimento deteriorado por *Desulfotomaculum nigrificans*, além do forte e desagradável odor de sulfeto, não apresenta nenhum outro odor putrefativo. Em enlatados, por exemplo, as embalagens não mostram sinais de estufamento, apresentando entretanto, odor a sulfeto de hidrogênio e o produto adquire aparência escura devido à reação entre o sulfeto e o metal do recipiente (5, 8). Apesar da legislação brasileira não estabelecer nenhum padrão quanto a contagem de bactérias causadoras de deterioração sulfídrica (*D. nigrificans*) em açúcar refinado, existe um padrão internacional proposto para este tipo de microrganismo que é de 5 esporos por 10 gramas de produto (5, 10).

De acordo com a Tabela 1, durante a contagem preliminar de 24 horas, nenhuma das 10 amostras analisadas apresentou desenvolvimento de bactérias de deterioração sulfídrica. No entanto, após 48 horas de incubação (período final) todas as amostras (100%) apresentaram-se fora do padrão proposto de 5 esporos/10g de produto (5). As contagens na ordem decrescente foram:  $10 > 2 > 9 > 7 > 5$  e  $6 > 8 > 4 > 3 > 1$ . A contagem de 24 horas é necessária, uma vez que os tubos inoculados que possam conter número elevado de colônias desses microrganismos tornam-se completamente enegrecidos, devido a formação excessiva de sulfeto de ferro, dificultando sua posterior contagem.

Os resultados mostraram que 100% das amostras analisadas estavam em desacordo com o padrão internacional proposto de 5 esporos/10 g de produto (5). Este fato no entanto, pode ser devido a diversos fatores como: elevado número inicial de bactérias nas amostras, processamento térmico inadequado, falha no resfriamento das amostras, assim como estocagem final a elevadas temperaturas. É necessário destacar que durante a realização das análises a metodologia utilizada mostrou-se eficaz, o que está de acordo com a literatura (2,3,10,12,14,15,18).

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos quanto a contagem de bactérias aeróbias mesófilas demonstraram menor vida útil para a amostra 5 e maior para a amostra 4, desde que armazenadas sob as mesmas condições. Embora tenha sido constatada a presença de bolores e leveduras, todas as amostras enquadraram-se dentro dos limites fixados pela legislação brasileira. Com relação a contagem de bactérias produtoras de deterioração do tipo acidez plana, somente uma amostra (10%) apresentou-se em desacordo com o padrão internacional proposto. Entretanto, no caso da contagem de bactérias causadoras de deterioração sulfídrica, todas as amostras apresentaram-se fora do padrão internacional de 5 esporos/10 g de produto.

Finalmente, para prevenir o desenvolvimento de microrganismos e conseqüentemente a deterioração sulfídrica, deve-se realizar um controle microbiológico para seleção das matérias-primas (açúcar, amido, etc) visando a ausência ou números baixos de esporos. Quando for o caso, as matérias-primas devem ser lavadas ou pré-esterilizadas. Pode-se também, proceder rápido resfriamento

do produto processado antes deste ser embalado, ou ainda, efetuar monitoramento microbiológico em amostras representativas de cada lote para avaliar o potencial de deterioração.

#### Abstract

Ten samples of various kinds of refined sugar from pubs supermarkets and sugar factory in São José do Rio Preto were submitted to microbiological analysis. It was researched the presence of mesophilic aerobic bacteria, moulds and yeasts, bacteria type "flat sour", and bacteria of hydrosulphuric deterioration. The results showed that the samples were in agreement with Brazilian legislation. However, in relation to the bacteria producers of "flat-sour", only one sample (10%) was in disagreement with the international patterns. In relation to the bacteria of hydrosulphuric deterioration, all samples (100%) were in disagreement with the international patterns of 5 spores/10 g of product.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Métodos recomendados para o exame microbiológico de alimentos. São Paulo : Polígono, 1972. p. 65-72.
- 02 BRASIL. Portaria n. 001 de 28 jan.1987. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial, Brasília, 25 fev.1987.
- 03 BUFTON, A.W.J. A note on the enumeration of thermophilic sulfate reducing bacteria (Clostridium nigrificans). J.of Applied Bacteriology, v. 22, n. 2, p. 278-280, 1959.
- 04 CAMPBELL, L.L., POSTGATE, J.R. Classification of the spore forming sulfate - reducing bacteria. Bacteriological Reviews, v. 29, n. 3, p. 359-363, Sep.1965.
- 05 CLARK, F.M., TANNER, F.W. Thermophilic canned food spoilage in sugar and starch. Food Research, v. 2, n. 1, p. 27-39, 1937.
- 06 COWAN, S.T. et al. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8.ed. Baltimore : Willians and Wilkins, 1974. 1267 p.
- 07 DETECTING and estimating numbers of thermophilic bacterial spores in sugars - Official first action. J.A.O.A.C., v. 55, n. 2, p. 445-446, 1972.
- 08 DOORES, S. Bacterial spore resistance: species of emerging importance. Food Technology, v. 37, n. 11, p. 127-134, Nov. 1983.
- 09 INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganisms in foods their significance and methods of enumeration. Toronto : University of Toronto, 1978.
- 10 \_\_\_\_\_. Microbial ecology of foods. New York : Academic Press, 1980. v. 2.



- 11 LEITÃO, M.F.F., UBOLDI EIROA, M.N. DELAZARI, I. Contaminação de matérias-primas e alimentos semi-processados de origem vegetal por esporos e bactérias. II. Clostridium sp mesófilos e acidúricos, C. Thermosaccharolyticum e Desulfotomaculum nigrificans. B.ITAL, Campinas, v. 20, n. 2, p. 115-129, abr./jun.1983.
- 12 LIN, C.C., LIN, K.C. Spoilage bacteria in canned foods. II. Sulfide spoilage in canned mushrooms and a versatile medium for the enumeration of Clostridium nigrificans. Applied Microbiology, v. 19, n. 2, p. 283-86, Feb.1970.
- 13 PESSINE, F.T.B., YOKOYA, F. Variação sazonal na contaminação microbiana de açúcar cristal e sobrevivência dos microrganismos durante seu armazenamento. R.Bras.Tecnol., São Paulo, v. 3, n. 1, p. 1-7, mar.1972.
- 14 POSTGATE, J.R. Differential media for sulphur bacteria. Journal of Science and Food Agriculture, v. 10, p. 669-674, Dec.1959.
- 15 \_\_\_\_\_. Versatile medium for the examination of sulfate reducing bacteria. Applied Microbiology, v. 11, p. 265-267, 1963.
- 16 POSTGATE, J.R. CAMPBELL, L.L. Identification of Coleman's sulfate reducing bacterium as a mesophilic relative of Clostridium nigrificans. J.Bacteriol., v. 86, p. 274-279, 1963.
- 17 SÃO PAULO. Decreto n. 12.486 de 20 out.1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Diário Oficial, 21 out.1978.
- 18 SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington : American Public Health Association, 1976. 702 p.
- 19 SPECK, R.L. Thermophilic organisms in food spoilage: sulfide spoilage anaerobes. J.Food Protec., v. 44, n. 2, p. 149-153, Feb.1981.
- 20 TANIKAWA, E., MOTOHIRO, T., AKIBA, M. Causes of can swelling and blackening of canned baby clams. II. Bacterial action involved in can swelling and blackening of baby clams. Journal of Food Science, v. 32, p. 231-234, 1967.
- 21 UBOLDI EIROA, M.N. O controle da qualidade microbiológica dos alimentos. B.ITAL, Campinas, v. 49, p. 1-32, 1977.
- 22 UBOLDI EIROA, M.N., LEITÃO, M.F.F., TANIWAKI, M.H. Estudo comparativo de modificações do meio ágar dextrose triptona para a contagem de esporos termófilos "flat-sour" em açúcar. Coletânea do ITAL, Campinas, v. 15, p. 113-126, 1985.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Gentil Luiz de Faria pelo auxílio na elaboração do resumo em inglês.