

## ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE AMENDOIM PROVENIENTES DO MERCADO PÚBLICO DE PORTO ALEGRE/RS

Liziane Spinelli<sup>1</sup>Letícia Longoni<sup>2</sup>Anelise Beneduzi da Silveira<sup>3</sup>

### RESUMO

O amendoim é uma leguminosa amplamente consumida apesar do grande risco de contaminação por fungos e bactérias. O objetivo deste estudo foi avaliar microbiologicamente a presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes, bactérias mesófilas aeróbias, bolores e leveduras, em amostras de amendoim torrado vendidas no mercado público de Porto Alegre/RS, armazenadas de três formas diferentes. Os resultados indicaram ausência de fungos ou leveduras, mas bactérias mesófilas aeróbias foram encontradas em todos os tipos de armazenagem, sendo que, no dispensador gravitacional (1V), a contagem foi de  $3,7 \times 10^2$  UFC/g, seguida do recipiente comum (2-G) com  $3,6 \times 10^2$  UFC/g e, em menor quantidade, o industrializado (1I) com  $2,7 \times 10^2$  UFC/g. Coliformes totais foram encontrados nas mesmas amostras, 1V ( $2,4 \times 10^2$  NMP/g), 2-G ( $1,3 \times 10^2$  NMP/g) e 1I ( $1,1 \times 10^1$  NMP/g). Foram isoladas dezoito bactérias, a maioria caracterizada como Gram-positiva e identificada a partir do sequenciamento do gene 16SrRNA. As bactérias patogênicas de importância em alimentos encontradas nas amostras de amendoim torrado analisadas foram *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* sp., que podem ter vindo do não seguimento das boas práticas de manipulação e de falta de assepsia no armazenamento.

**Palavras-chave:** Amendoim; Bolores; Leveduras; Bactérias; Coliformes; Contaminação

### ABSTRACT

**Microbiological analysis of peanuts samples from Porto Alegre/RS public market.** Peanuts are a widely consumed legume, despite the risk of contamination by fungi and bacteria being large. The objective of this study was to evaluate the presence of total coliforms, thermotolerant coliforms, aerobic mesophilic bacteria, molds and yeasts, samples of roasted peanuts sold in the public market of Porto Alegre/RS stocked in three different ways. The results indicated absence of fungi or yeasts, but aerobic mesophilic bacteria were found in all types of storage, and in the gravitational dispenser (1V) the count was  $3,7 \times 10^2$  UFC/g, followed by the bulk bin (2-G) with  $3,6 \times 10^2$  UFC/g and in smaller quantity, the industrialized (1I) with  $2,7 \times 10^2$  UFC/g. Total coliforms were found in the same samples, 1V ( $2,4 \times 10^2$  NMP/g), 2-G ( $1,3 \times 10^2$  NMP/g) and 1I ( $1,1 \times 10^1$  NMP/g). Eighteen bacteria, mostly Gram positive, were identified from 16SrRNA gene sequencing. Pathogenic bacteria of importance in foods found in the analyzed peanut samples were *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* sp., and this contamination may come from non-compliance with good practices in handling and lack of asepsis in storage.

**Keywords:** Peanuts; Molds; Yeasts; Bacteria; Coliforms; Contamination

<sup>1</sup> Universidade La Salle – UNILASALLE, Canoas, RS, Brasil. E-mail para correspondência: [liziane\\_spinelli@hotmail.com](mailto:liziane_spinelli@hotmail.com)

<sup>2</sup> Depto. de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária – (DDPA, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul – SEAPI, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> PPG em Avaliação de Impactos Ambientais, Universidade La Salle – UNILASALLE, Canoas, RS, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é considerado uma leguminosa de grande valor nutricional por ser rico em proteínas e lipídios. Pode ser utilizado *in natura*, com seus derivados, e também para extração do óleo que é empregado em diversos setores industriais (Cunha *et al.*, 2013), sendo considerado um alimento funcional por possuir, a cada 100 g, cerca de 0,66 mg de vitamina E, 4 mcg de selênio e 16,5 g de gordura poli-insaturada (Tucunduva, 2013). Segundo Dolinsky (2009), alimentos funcionais são aqueles que em forma natural oferecem benefícios além dos nutrientes de sua composição química e que podem, inclusive, auxiliar na redução de doenças crônicas não-transmissíveis. A vitamina E e o selênio mostram-se eficientes contra o câncer e doenças relacionadas ao envelhecimento, como a aterosclerose e artrite, e o consumo de ácidos graxos poli-insaturados é relacionado com a melhora da concentração de colesterol plasmático, reduzindo a hipercolesterolemia (Dolinsky, 2009). Por outro lado, o amendoim está entre os principais alimentos alergênicos, ficando atrás apenas do leite de vaca e dos ovos, podendo ocasionar uma reação anafilática no indivíduo alérgico quando exposto ao alimento. Porém, essa alergia é mais comum entre crianças americanas, sendo que no Brasil o índice é praticamente nulo (Cozzolino, 2012).

Um dos problemas relacionados à produção de amendoim é sua contaminação por microrganismos, principalmente fungos produtores de micotoxinas. No armazenamento, a umidade é um fator favorável à contaminação de bolores em alimentos que possuem uma alta quantidade de gordura e baixo teor de água, como o amendoim (Jay, 2005). Conforme destaca Forsythe (2013), as micotoxinas são produtos tóxicos derivados do metabolismo de alguns fungos e que possuem alta carcinogenicidade, principalmente a nível hepático. Os fungos produtores de micotoxinas, tais como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, desenvolvem-se em alimentos tanto de origem animal como vegetal. Em especial, a micotoxina denominada aflatoxina é produzida por algumas espécies de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus*, sendo encontrada com frequência em alimentos como milho, amendoim e leite (Forsythe, 2013).

De acordo com a Resolução-RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as amostras indicativas, na qual se enquadra o amendoim, não devem ultrapassar o valor de contagem de  $10^4$  para bolores e leveduras por grama, devido à problemática de contaminação, sendo que as amostras também não devem ultrapassar o valor de contagem de  $10^3$  para coliformes termotolerantes por grama. Um dos métodos utilizados para a verificação do estado de higiene e sanificação dos alimentos é a detecção desses microrganismos indicadores, que estão diretamente correlacionados com a presença de patógenos e com a ocorrência em ambientes intestinais (Jay, 2005). Os coliformes totais são bastonetes Gram-negativos, não-esporulados e representados por quatro gêneros da família Enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*, sendo que a *Escherichia coli* diferencia-se por ter, como seu hábitat primário, o trato intestinal do homem e de animais, recebendo o nome de coliforme termotolerante por fermentar a lactose com produção de gás à 44-45,5°C. Os demais gêneros podem ser encontrados no solo e em vegetais, além das fezes (Franco e Landgraf, 2003).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar microbiologicamente, quanto à presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes, bactérias mesófilas aeróbias, bolores e leveduras, amostras de amendoim torrado (pronto para consumo) vendidas no mercado público de Porto Alegre/RS, expostas de três formas diferentes: em dispensador gravitacional, em recipiente comum e embalados da indústria.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostragem

Um total de seis amostras de amendoim torrado sem sal, disponíveis no Mercado Público de Porto Alegre/RS, foram analisadas microbiologicamente. Quatro amostras foram coletadas nos recipientes a granel, sendo duas delas em dispensadores gravitacionais (denominadas amostras 1-V e 2-V) e duas amostras em recipientes comuns (denominadas amostras 1-G e 2-G). Também foram coletados dois exemplares industrializados de marcas distintas (denominadas amostras 1-I e 2-I). Cada amostra foi adquirida em estabelecimentos diferentes. Após a coleta, o material foi encaminhado para o Laboratório de Microbiologia Agrícola/Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI/RS) para as análises.

Os procedimentos seguiram as metodologias descritas por Silva *et al.* (2001) com modificações. Primeiramente, as amostras de amendoim foram maceradas dentro da própria embalagem em condições assépticas e, após, pesadas 25 g que foram adicionadas em *erlenmeyers* contendo 225 ml de água salina peptonada 0,1%, obtendo-se, assim, a diluição  $10^{-1}$ , que ficou sob agitação por 30 minutos. A partir da solução  $10^{-1}$ , retirou-se 10 ml para *erlenmeyers* contendo 90 ml de água salina peptonada 0,1%, obtendo-se a diluição  $10^{-2}$ . O processo se repetiu para a obtenção da diluição final  $10^{-3}$ . A partir desse procedimento, foram feitos ensaios para quantificar as bactérias mesófilas aeróbias, os bolores e leveduras e os coliformes totais e os termotolerantes.

### Contagem de Bactérias Mesófilas Aeróbias

A semeadura para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias foi realizada colocando-se 1 ml de cada diluição obtida anteriormente em placas de petri contendo meio PCA (*Plate Count Agar*, Himedia). Em seguida, foi feito o espalhamento utilizando-se a alça de *drigalski* previamente flambada com álcool 70%. Cada amostra foi feita em triplicata e mantida em estufa a 35°C por 4 dias, e, após, foi realizada a contagem.

### Isolamento de Linhagens Bacterianas

As amostras que obtiveram crescimento bacteriano no ágar PCA tiveram uma colônia de cada placa, morfologicamente diferente, isolada e incubada a 30°C em meio líquido TSB (*Tryptone Soya Broth*, Himedia). A partir desse resultado, foi realizada a coloração de Gram para verificação da pureza e da morfologia bacteriana.

### Extração de DNA e Identificação das Linhagens Bacterianas Isoladas

As células previamente crescidas foram centrifugadas por 3 minutos a 12.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado ao precipitado (*pellet*) 700 µL de TES (10 mL/L de Tris 1 M pH 8; 50 mL/L de EDTA 0,5 M pH 8 e 30 mL/L de NaCl 5 M), seguido de homogeneização e nova centrifugação por 5

min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e, então, adicionado 500 µL de TE1 (10 mL/L de Tris 1 M pH 8 e 50 mL/L de EDTA 0,5 M pH 8) homogeneizado até que o *pellet* fosse ressuscitado, para ser acrescentado 25 µL de lisozima e, então, incubado a 37°C por 1 hora. Após as amostras esfriarem a temperatura ambiente, foi adicionado 108 µL de dodecil sulfato de sódio 20% (SDS) quente e 19 µL de proteinase K e, então, incubado a 60°C por 15 minutos. Após o esfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de acetato de amônia 7,5 M e acondicionado no gelo por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, completado o volume com água e adicionado 1 volume de clorofórmio, e, novamente, centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, adicionado novamente 1 volume de clorofórmio e centrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm. Foram adicionados 8 µL de cloreto de sódio 5 M e 0,6 volumes de isopropanol gelado, mantido no gelo por 10 minutos e, após, centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm. Após as amostras secarem em temperatura ambiente, o precipitado foi ressuscitado em 30 µL de TE2 (10 mL/L de Tris 1 M pH 8 e 2 mL/L de EDTA 0,5 M pH 8). O procedimento seguiu as orientações de Sambrook e Russel (2001).

#### Amplificação do Gene 16S rRNA

A reação de amplificação teve os seguintes reagentes: 1 µL de DNA molde; 2,5 µL de tampão de PCR 10x; 0,25 µL de uma solução com 0,15 mmol L<sup>-1</sup> de cada DNTP; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup>; 1 µL de cada oligonucleotídeo 10 mmol L<sup>-1</sup>; 0,4 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen); e água ultrapura estéril para o volume final de 25 µL. A sequência do gene 16S rRNA quase completa (1500 pb) foi amplificada utilizando os *primers* 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' (Stackebrandt & Liesack 1993) e 5'AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC 3' (Edwards *et al.*, 1989). As reações foram realizadas com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por: 1 fase de desnaturação com duração de 1 min a 94°C; 1 fase de anelamento de 1 min a 51°C; e uma fase de extensão de 1 min a 72°C. A extensão final teve um ciclo a 72°C por 5 min. As reações foram realizadas em um termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystem). Os produtos de amplificação foram corados com *blue green* e, após, visualizados em eletroforese a 70V por 50 min, em gel de agarose 1%. Foi utilizado o marcador molecular 1 Kb *plus DNA ladder* (Invitrogen) (Sambrook e Russel, 2001). Os fragmentos obtidos dos isolados bacterianos foram sequenciados em uma orientação no laboratório ACT Gene do Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS, no sequenciador automático *ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* através do programa BLASTN (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências dos 18 isolados bacterianos, obtidos neste estudo, foram depositadas no banco de dados com os números de acesso MG065709 a MG065726.

#### Contagem de Bolores e Leveduras

A semeadura para a contagem de bolores e leveduras foi feita transferindo 1 ml de cada diluição obtida anteriormente em placas de petri contendo o meio PDA (*Potato Dextrose Agar*, Himedia) adiciona-

do de ácido tartárico 10%. Em seguida, foi feito o espalhamento utilizando a alça de *drigalski* previamente flambada com álcool 70%. Cada amostra foi feita em triplicata e mantida em estufa a 29°C por 7 dias, e, após, foi realizada a contagem.

#### Análise de Coliformes Totais e Termotolerantes

Para a quantificação de coliformes totais e termotolerantes, foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), no qual as diluições foram inoculadas em substrato cromogênico Colilert® (*Idexx*), em 3 séries de 5 tubos, os quais foram incubados por 24h a 35°C. Os tubos com mudança da cor original para amarelo foram considerados positivos para coliformes totais. Para a confirmação dos coliformes termotolerantes, os tubos amarelos foram submetidos à luz ultravioleta, sendo considerados positivos aqueles com emissão de fluorescência azul.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Contagem de Bactérias Mesófilas Aeróbias

Conforme descrito por Silva *et al.* (2001), foram consideradas para a contagem as placas com no mínimo 25 colônias, sendo aproximadamente 50% das amostras analisadas. A amostra coletada no dispensador gravitacional 1-V obteve o maior número de colônias bacterianas ( $3,7 \times 10^2$  UFC/g), seguida pela amostra no recipiente comum 2-G ( $3,6 \times 10^2$  UFC/g) conforme consta na tabela 1. Quanto à amostra industrializada 1-I, não se esperava encontrar contaminantes, mas houve presença significativa de bactérias ( $2,7 \times 10^2$  UFC/g), ou seja, em todos os tipos de apresentação houve contaminação bacteriana no amendoim. Os itens industrializados de marcas distintas não possuem o selo Pró-Amendoim que garante uma fabricação segura de alimentos à base de amendoim de acordo com as legislações vigentes segundo a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB). Sugere-se que a maior contagem bacteriana no dispensador gravitacional pode ser justificada pela maior manipulação, visto que esse recipiente é localizado em altura, como também pela falta de higienização antes da reposição do amendoim.

**Tabela 1.** Contagem de bactérias mesófilas aeróbias nas diferentes amostras de amendoim torrado coletadas no Mercado Público de Porto Alegre/RS.

Amostra	Tipo de recipiente	UFC/g
1-G	Recipiente comum	0
2-G	Recipiente comum	$3,6 \times 10^2$
1-V	Dispensador gravitacional	$3,7 \times 10^2$
2-V	Dispensador gravitacional	0
1-I	Embalagem industrializada	$2,7 \times 10^2$
2-I	Embalagem industrializada	0

Silva (2002) realizou a contagem de bactérias mesófilas aeróbicas, segundo o método *SimPlate* em amendoim cru industrializado, e obteve um resultado semelhante ao deste estudo, entre  $10^2$  a  $10^3$  UFC/g UFC/g, com a diferença que foi analisado, neste trabalho, o amendoim já torrado e pronto para o consumo.

Em outro estudo, sendo analisadas amêndoas torradas, foi encontrado o valor de  $1,2 \times 10^4$  para bactérias mesófilas, sendo que essa contaminação provavelmente ocorreu após o processamento do alimento (Souza *et al.*, 1987). Ao analisar castanhas de caju processadas, Munizet *et al.* (2006) identificaram bactérias mesófilas aeróbias em amostras de quatro das seis fábricas estudadas, com um valor de contagem variando de 4,0 a 7,0 logUFC/g.

As contaminações fitopatogênicas podem afetar o amendoim no plantio (solo e água) por algumas bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Na pós-colheita, o ar e a poeira podem estar contaminados mais comumente com bactérias Gram-positivas. Utilizados para estipular os microrganismos que podem estar presentes nos alimentos, os fatores intrínsecos dos alimentos são a atividade de água (Aa), a acidez (pH), o potencial de oxi-redução (Eh) e a composição química. Considerando, por exemplo, que a Aa das nozes (que é semelhante ao amendoim) é de 0,66 a 0,84, podemos citar como contaminantes as bactérias halofílicas (valor de Aa mínimo: 0,75) (Silva *et al.*, 2001). Entretanto, na legislação brasileira, a única bactéria que possui parâmetro de detecção para o amendoim é a *Salmonella* sp., devendo estar ausente a cada 25g do alimento (ANVISA Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001). Cavallaro *et al.* (2011) relacionaram um surto de salmonelose com o consumo de amendoim torrado e subprodutos frisando que a contaminação ocorreu após a primeira torra do alimento e que a *Salmonella* sobrevive em produtos de baixa umidade, como a manteiga de amendoim, por até vinte e quatro meses. Em outro estudo, analisando a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* em amendoim e subprodutos, a contaminação estava presente apenas no local de trabalho e nos manipuladores, indicando que o processamento foi efetivo na eliminação de bactérias, porém a contaminação cruzada ainda é um fator de risco na indústria alimentícia (Carminati *et al.*, 2016).

### Isolamento e Identificação das Linhagens Bacterianas

A partir do crescimento bacteriano no meio ágar PCA, foram escolhidas as colônias que apresentaram diferentes morfologias, em cada uma das seis amostras. Foram obtidos dezoito isolados representativos no total, sendo a maioria caracterizada como Gram-positivos e um isolado como Gram-negativo (Tabela 2). O DNA de todos os isolados bacterianos foi extraído e submetido à PCR para a amplificação de um fragmento do gene 16 SrRNA para a identificação das espécies e/ou gêneros a que pertencem as linhagens bacterianas isoladas (Tabela 2).

Foram identificados três isolados da amostra 2-G e dois da amostra 2V que apresentaram contaminação por *Bacillus cereus*, bactéria frequentemente relacionada à surtos de doenças transmitidas por alimentos. Lentz (2014) evidenciou, em um estudo realizado em Porto Alegre, trinta e oito surtos causados por essa bactéria entre os anos de 2003 e 2013, evidenciando falha nas boas práticas em manipulação de alimentos. Um episódio de contaminação aguda por *Bacillus cereus* é caracterizado por gastroenterite com sintomas de diarreia, náusea e vômito devido às toxinas produzidas pela bactéria (Tortora *et al.*, 2012). Segundo Forsythe (2013), esse microrganismo possui bom desenvolvimento em alimentos cozidos devido à inativação da microflora competidora pela cocção e é comum ser encontrado em alimentos sendo que as intoxicações ocorrem com uma contagem média de  $10^5$  UFC/g.

**Tabela 2.** Caracterização e identificação das linhagens bacterianas isoladas, através da coloração de Gram e do sequenciamento do fragmento 16 SrRNA.

Isolado/Amostra	Gram	Identificação	E-value
1 – 1G	Coco bacilo Gram-Negativo	<i>Staphylococcus</i> sp.	0.0
3 – 2-G	Bacilo Gram-Positivo	<i>Exiguobacterium indicum</i>	0.0
4 – 2-G	Bacilo Gram-Positivo	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	0.0
7 – 2-G	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus cereus</i>	0.0
9 – 2-G	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus cereus</i>	1e-81
10 – 2-G	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus cereus</i>	0.0
13 – 1V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	9e-161
14 – 1V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus aryabhattai</i>	0.0
17 – 1V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0.0
31 – 1V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.0
19 – 2V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus megaterium</i>	0.0
20 – 2V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus</i> sp.	1e-149
22A – 2V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus cereus</i>	0.0
22B – 2V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus cereus</i>	0.0
23 – 2V	Cocos Gram-Positivo	<i>Staphylococcus warneri</i>	0.0
32 – 2V	Bacilo Gram-Positivo	<i>Bacillus subtilis</i>	0.0
24 – II	Bacilo Gram-Negativo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0
27 – II	Cocos Gram-Positivo	<i>Micrococcus luteus</i>	0.0

As demais espécies de *Bacillus* encontradas nas amostras 1V e 2V, tais como *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aryabhattai* e *B. megaterium* são onipresentes em sistemas agrícolas (Gardener, 2004), assim como todas as bactérias Gram-positivas formadoras de esporos, sendo eficientes colonizadores de diversos ambientes devido a essa característica (Velasco *et al.*, 2016). Além disso, *B. thuringiensis* e *B. subtilis* são utilizados comercialmente no plantio de amendoim, algodão, tomate, milho hortaliças e culturas produtoras de grãos no combate às doenças provenientes de fungos e outras pragas agrícolas (Júnior *et al.*, 2009; Lanna Filho *et al.*, 2010), sendo que a espécie *Bacillus thuringiensis* também está relacionada à citotoxicidade em surtos de gastroenterite (Granum e Lund, 1997).

Outra espécie bacteriana identificada no amendoim analisado é a *Exiguobacterium acetylicum*, encontrada na amostra 2-G. O gênero *Exiguobacterium* possui uma grande diversidade na sua distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes ambientes (Selvakumar *et al.*, 2009). *E. acetylicum* pode ser utilizada como biocontroladora de fungos por causar deformidades nas hifas, impedindo a contaminação de alimentos como a ervilha (Selvakumar *et al.*, 2009). A espécie *Exiguobacterium indicum*, também encontrada na amostra 2-G, é utilizada em indústrias por produzir enzimas como gelatinase, agarase e lipase, bem como o complemento pigmentar beta caroteno (Anh *et al.*, 2016).

Diversas espécies de *Staphylococcus* são encontradas facilmente em unidades de alimentação ao investigar um surto alimentar, motivo de preocupação pela sua patogenicidade proveniente da má higiene (Mello *et al.*, 2014; Chaves *et al.*, 2017). Foram encontradas, nesse estudo, *Staphylococcus* sp. na amostra 1G e *Staphylococcus warneri* na amostra 2V. Segundo Forsythe (2013), os estafilococos, além de estarem presentes no ar e na água, alojam-se nas vias nasais, garganta, pele e cabelo de indivíduos saudáveis, fazendo dos manipuladores de alimentos os principais vetores de contaminação, seguido dos equipamentos e superfícies. Além disso, a toxina estafilocócica, responsável pela intoxicação, é termoestável, não sendo inativada por regimes normais de cocção.

*Pseudomonas aeruginosa*, encontrada na amostra 1I, é uma bactéria patogênica que se desenvolve

em tubulações de água pela formação de um biofilme, sendo um risco para a saúde pública, visto que surtos em hospitais e clínicas já foram relatados (Galvão *et al.*, 2006; Peresi *et al.*, 2011). Essa bactéria é resistente a muitos antibióticos e desinfetantes e, no organismo humano, pode infectar o trato urinário e causar sepse (Tortora *et al.*, 2012). Em relação aos alimentos, a água mineral envasada vem sendo motivo de preocupação pela fácil contaminação por *Pseudomonas aeruginosa*, ficando sob responsabilidade da empresa envasadora a análise das características microbiológicas na fonte, poço e no produto final (ANVISA Resolução nº 310/1999). Outra bactéria formadora de biofilme, encontrada, também, na amostra 1I, é a espécie *Micrococcus luteus* (Matsuura *et al.*, 2013).

As espécies de *Pseudomonas* também são consideradas microrganismos deteriorantes, pois, devido às enzimas lipase e protease, conferem ao alimento um odor rançoso e sabor amargo, respectivamente (Forsythe, 2013). A presença dessas bactérias formadoras de biofilmes nas amostras de amendoim coletadas sugere a situação precária das tubulações, além da falha em boas práticas em manipulação no setor de produção do alimento.

### Contagem de Bolores e Leveduras

Não houve crescimento de bolores e leveduras nas amostras de amendoim analisadas. Por se tratar de amostras de amendoim torrado, a possível contaminação fúngica vinda da colheita e armazenamento pode ter sido eliminada no processo de torra, visto que, segundo Jay (2005), bolores e leveduras dificilmente crescem em faixas de temperaturas termofílicas (entre 55°C e 65°C). Em amêndoas torradas, conforme analisaram Souza *et al.* (1987), não houve crescimento de bolores e leveduras, assim como neste estudo, na qual o processamento do amendoim foi eficiente na eliminação desses microrganismos.

### Análise de Coliformes Totais e Termotolerantes

A análise do índice de coliformes, realizada pela técnica do número mais provável (NMP), evidenciou que os coliformes totais foram encontrados em três das seis amostras analisadas, as mesmas amostras que também estavam com contaminação bacteriana: 2-G, 1-V e 1-I. A amostra 1-V teve o maior índice de coliformes totais com  $2,4 \times 10^2$  NMP/g; a amostra 2-G teve o valor de  $1,3 \times 10^2$  NMP/g; e a amostra 1-I o menor valor de  $1,1 \times 10^1$  NMP/g, conforme a tabela 3. Não foi constatada a presença de coliformes termotolerantes em nenhuma das amostras analisadas. Silva (2002) reportou o valor de  $10^1$  NMP/g para coliformes totais e isenção de coliformes termotolerantes em amendoim cru industrializado. Um estudo com castanhas de caju torradas constatou o número médio de 3,30 NMP/g tanto de coliformes totais quanto de termotolerantes para itens industrializados (Rodrigues *et al.*, 2012). Essa presença de coliformes totais em alimentos como o amendoim representa a falta de procedimentos assépticos que o produto recebeu desde os manipuladores até seu armazenamento. Apesar de não haver níveis de referência para coliformes totais na legislação vigente, deseja-se que esse número seja o menor possível (ANVISA Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001). Carminati *et al.* (2016) analisaram a quantidade de coliformes na fabricação de subprodutos de amendoim, sendo que a presença se deu apenas na matéria-prima, evidenciando que o processamento do amendoim foi eficaz para a eliminação de coliformes.



**Tabela 3.** Resultados da análise de coliformes totais e termotolerantes nas diferentes amostras de amendoim torrado coletadas no Mercado Público de Porto Alegre/RS.

Amostra	Coliformes totais NMP/g	Coliformes termotolerantes NMP/g
1-G	0	0
2-G	1,3 x 10 <sup>2</sup>	0
1-V	2,4 x 10 <sup>2</sup>	0
2-V	0	0
1-I	1,1 x 10 <sup>1</sup>	0
2-I	0	0

### CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que a torra do amendoim é eficiente para eliminação dos fungos e leveduras provenientes da pré-colheita até a estocagem. Contudo, as bactérias utilizadas na cultura do alimento ainda permaneceram. No entanto, a etapa de processamento e manipulação do alimento, provavelmente foi a causadora da contaminação do amendoim por bactérias patogênicas como *Bacillus cereus* (amostras 2-G e 2V), *Staphylococcus* sp. (amostra 1G) e *Pseudomonas aeruginosa* (amostra 1I), bem como a presença de coliformes totais em todos os tipos de armazenagem analisados, sendo que em dispensador gravitacional a contagem foi maior, seguida do recipiente comum e, em menor quantidade, o industrializado. Não foi observado o crescimento de fungos ou leveduras ou a presença de coliformes termotolerantes. Foram isoladas dezoito linhagens bacterianas contaminantes, sendo a maioria caracterizada como Gram-positiva e uma como Gram-negativa. Essa contaminação pode vir do não seguimento das boas práticas em fabricação e manipulação, bem como da falta de assepsia no armazenamento do amendoim nos locais de venda e a má higienização dos recipientes. Além disso, o amendoim está sujeito à toxicidade das bactérias vindas da cultura.

### REFERÊNCIAS

- ABICAB, Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br>>. Acesso em: 26 jun. 2017.
- ANH, V. et al. 2016. Characterization of *Exiguobacterium indicum* Pn04 isolated from hot spring. **Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences**, 5:34-37.
- ANVISA. Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 e Resolução nº 310/1999. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 16 abr. 2017.
- CARMINATI, J. et al. 2016. Microbiological contamination in peanut confectionery processing plants. **Journal of Applied Microbiology**, 121:1071-1078.
- CAVALLARO, E. et al. 2011. *Salmonella typhimurium* infections associated with peanut products. **The New England Journal of Medicine**, 365:601-610.
- CHAVES, R. et al. 2017. Evaluation of *Staphylococcus* spp. in food and kitchen premises of Campinas, Brazil. **Food Control**, 84:463-470.
- COZZOLINO, S. M. F. 2012. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 4. ed. São Paulo: Manole, 668p.
- CUNHA, J. et al. 2013. Diversidade cultural de bactérias isoladas de nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) cultivados em solos do Nordeste do Brasil. In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO,

2013, Florianópolis, p.1-4.

JÚNIOR, P. et al. 2009. Comercialização de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas e pragas no Brasil. **Informe Agropecuário**, **30**:116-123.

DOLINSKY, M. 2009. **Nutrição Funcional**. São Paulo: Roca, 204p.

EDWARDS, U. et al. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, **17**:7843-7853.

FORSYTHE, J. S. 2013. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 602p.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M.. 2003. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 28p.

GALVÃO, C.; MOTTA, G.; LEITE, M. 2006. Análise quantitativa da contaminação da água das tubulações de equipamentos odontológicos. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**, **48**:1-7.

GARDENER, B. B. M. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. Symposium: the Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp. **Phytopathology**, **94**:1252-1258.

GRANUM, P.; LUND, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, **157**:223–228.

JAY, J. M. 2005. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 712p.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. 2010. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, **4**:12-20.

LENTZ, S. A. M. 2014. **Ocorrência de *Bacillus cereus* em surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados e investigados no município de Porto Alegre de 2003 a 2013**. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 38p.

MATSUURA, K. et al. 2013. Detection of *Micrococcus Luteus* biofilm formation in microfluidic environments by pH measurement using an ion-sensitive field-effect transistor. **Sensors**, **13**:2484-2493.

MELLO, J. et al. 2014. Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp. in food services. **Brazilian Journal of Microbiology**, **45**:1031-1037.

MUNIZ, C. et al. 2006. Effect of processing conditions on the microbiological quality of cashew nuts. **Brazilian Journal of Food Technology**, **9**:33-38.

PERESI, J. et al. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: ocorrência e suscetibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de amostras de água tratada utilizada em solução de diálise. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **70**:542-547.

RODRIGUES, A. et al. 2012. Qualidade microbiológica de castanhas de caju (*Anacardium occidentale*, L.) industrializadas e processadas artesanalmente. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **71**:415-419.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. 2001. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2344p.

SELVAKUMAR, G. et al. 2009. *Exiguobacterium acetylicum* strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **25**:131-137.

SILVA, M. 2002. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, 87p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. 2001. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 536p.

SOUZA, M. et al. 1987. Caracterização microbiológica de amêndoa torrada e salgada de castanha-do-brasil. **Ciência Agrônômica**, **18**:161-166.

- STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W. 1993. Nucleic acids and classification. In: M. Goodfellow; A. G. O'Donnell (Org.). **Handbook of New Bacterial Systematics**. London: Academic Press, p. 152–189.
- TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. 2012. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 894p.
- TUCUNDUVA, S. 2013. **Tabela de Composição de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 6p.
- VELASCO, C. R. et al. 2016. Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. **Revista Mexicana de Fitopatología**, 34:84-99.