

# **Análise da contaminação de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em açúcar cristal**

**Heleno Alves da Silva Neto**

(Aluno)

Fatec Praia Grande

heleno.aneto@gmail.com

**Prof<sup>a</sup> Dra. Janara de Camargo Matos**

(Orientadora)

Fatec Praia Grande

janara.matos@fatec.sp.gov.br

## **RESUMO**

A segurança microbiológica dos alimentos é um tema de crescente preocupação, especialmente no contexto de produtos destinados à exportação. O açúcar cristal, amplamente utilizado como insumo em diversas indústrias alimentícias, é um exemplo de produto que, embora considerado de baixo risco microbiológico, pode ser suscetível à contaminação durante o transporte e armazenamento. Entre os micro-organismos de maior relevância nesse contexto, destacam-se as bactérias *Escherichia coli* (*E.coli*) e *Salmonella* spp, frequentemente associadas a problemas de qualidade do produto e potenciais riscos à saúde pública. Este estudo tem como objetivo investigar o nível de contaminação por *E.coli* e *Salmonella* spp no açúcar cristal exportado, analisando amostras transportadas por vagões e carretas. A pesquisa busca determinar a predominância dessas bactérias, identificar os principais fatores contribuintes para a contaminação e avaliar os riscos envolvidos para a segurança do produto e da saúde pública. A problemática em questão gira em torno do seguinte questionamento: qual é o nível de contaminação por *E.coli* e *Salmonella* spp no açúcar cristal exportado durante o transporte e quais são as consequências para a qualidade e segurança do produto, bem como para a saúde pública? O artigo apresenta uma revisão dos principais fatores de contaminação durante o transporte, uma análise dos riscos envolvidos e uma discussão sobre medidas de controle que podem ser implementadas para aprimorar a segurança microbiológica do açúcar cristal exportado. As metodologias de análises microbiológicas basearam-se em normas ICUMSA GS-52 (2022) e ISO ISO/ts 6579-2:2019. Os resultados demonstraram ausência total de *E.coli* e *Salmonella* spp., sugerindo que as condições logísticas foram adequadas para preservar a qualidade microbiológica. Apesar da validação da eficácia dos controles existentes, ressaltasse a importância da inovação em embalagens e transportes para garantir a segurança em larga escala.

**Palavras chaves:** *E. coli*, *Salmonella* spp., Contaminação Bacteriana, Controle de Qualidade, Açúcar cristal.

## ABSTRACT

The microbiological safety of food is a topic of growing concern, especially in the context of products destined for export. Crystal sugar, widely used as an input in several food industries, is an example of a product that, although considered to have low microbiological risk, may be susceptible to contamination during transportation and storage. Among the most relevant microorganisms in this context, the bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Salmonella* spp stand out, frequently associated with product quality problems and potential risks to public health. This study aims to investigate the level of contamination by *E. coli* and *Salmonella* spp in exported crystal sugar, analyzing samples transported by rail cars and semi-trailers. The research seeks to determine the predominance of these bacteria, identify the main factors contributing to contamination and assess the risks involved for product safety and public health. The problem in question revolves around the following question: what is the level of contamination by *E. coli* and *Salmonella* spp in exported crystal sugar during transportation and what are the consequences for the quality and safety of the product, as well as for public health? The article presents a review of the main factors of contamination during transportation, an analysis of the risks involved and a discussion of control measures that can be implemented to improve the microbiological safety of exported crystal sugar. The microbiological analysis methodologies were based on ICUMSA GS-52 (2022) and ISO ISO/ts 6579-2:2019 standards. The results demonstrated a total absence of *E. coli* and *Salmonella* spp., suggesting that the logistical conditions were adequate to preserve microbiological quality. Despite the validation of the effectiveness of existing controls, the importance of innovation in packaging and transportation to ensure large-scale safety is highlighted.

**Keywords:** *E. coli*, *Salmonella* spp., Bacterial Contamination, Quality Control, Crystal Sugar.

## INTRODUÇÃO

A contaminação de alimentos por *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella* spp. representa uma preocupação significativa para a segurança alimentar, sendo essas bactérias responsáveis por diversas infecções alimentares. No contexto do açúcar cristal, diversos fatores podem comprometer o controle microbiológico, impactando negativamente a qualidade do produto final e apresentando riscos à saúde dos consumidores.

A principal fonte de contaminação do açúcar cristal está no solo, devido à microbiota rica em bactérias, leveduras e bolores que aderem à cana-de-açúcar. Durante o processo de colheita, a terra carregada juntamente com a cana contribui para a presença de bactérias termofílicas, como as produtoras de acidez plana ("*flat sour*"), que podem deteriorar o produto. Até mesmo fatores climáticos, como chuvas, intensificam essa contaminação (Oliveira, 2010).

Dentre os grupos bacterianos de maior relevância estão os coliformes totais, que incluem enterobactérias capazes de fermentar lactose com produção de gás entre 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies atendem a essa definição, incluindo *E. coli* e outras bactérias de origem

entérica e não entérica. Por ser amplamente utilizado na indústria alimentícia, o açúcar cristal está sujeito a rigorosos padrões microbiológicos que não permitem a presença de *Salmonella* spp. em 25g de amostra (Oliveira, 2010).

No Brasil, o transporte e armazenamento de açúcar cristal é realizado por grandes operadores logísticos, como a CLI (Corredor Logística e Infraestrutura) e a Rumo Logística. Essas empresas utilizam uma infraestrutura moderna e integrada, incluindo terminais portuários e ferroviários, para garantir eficiência e segurança na movimentação do produto, especialmente no contexto da exportação.

O objetivo deste estudo é investigar o nível de contaminação por bactérias *E.coli* e *Salmonella* spp. no açúcar cristal exportado oriundo do transporte por vagões e carretas. Os objetivos específicos são: determinar a predominância das bactérias *E. coli* e *Salmonella* spp. nas amostras de açúcar cristal exportado durante o transporte por vagões e carretas; identificar os principais fatores que contribuem para a contaminação; apresentar os riscos associados à presença dessas bactérias para a qualidade e segurança do produto; avaliar as implicações para a saúde pública; e propor estratégias de controle e prevenção para minimizar os riscos identificados.

## **1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **1.1 Contaminação de alimentos**

A contaminação alimentar é uma preocupação global que afeta milhões de pessoas todos os anos, com impactos significativos na saúde pública e na economia. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 1 em cada 10 pessoas no mundo adoece devido ao consumo de alimentos contaminados, resultando em aproximadamente 420 mil mortes anuais, das quais 125 mil ocorrem em crianças menores de cinco anos. As doenças causadas por bactérias como *Salmonella* spp. e *E. coli*, além de outros agentes patogênicos, estão entre as principais causas dessas enfermidades (OMS, 2024).

A OMS também alerta para as perdas econômicas associadas aos alimentos inseguros, estimadas em 110 bilhões de dólares por ano, devido a despesas médicas e perdas de produtividade. Essas contaminações podem ocorrer em diversas etapas da cadeia de produção alimentar, desde o cultivo até o consumo final, destacando a importância de boas práticas de higiene, transporte seguro e armazenamento adequado para reduzir os riscos. Ferramentas como o Codex Alimentarius, desenvolvidas pela OMS, oferecem padrões internacionais de segurança alimentar e orientações para fortalecer sistemas nacionais de controle (OMS, 2024).

A contaminação microbiológica em alimentos representa um problema significativo de saúde pública no Brasil, sendo uma das principais causas de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Este fenômeno ocorre ao longo de diferentes etapas da cadeia produtiva, abrangendo desde a produção até o consumo, e está associado à presença de microrganismos patogênicos que podem comprometer a qualidade e a segurança dos alimentos. (Welker *et al.*, 2009). Entre os agentes patogênicos mais frequentemente identificados em análises microbiológicas de alimentos, destacam-se:

- *Salmonella spp.*: responsável por cerca de 37% das contaminações;
- *Staphylococcus aureus*: presente em aproximadamente 28% das amostras analisadas;
- *Escherichia Coli*: com 22% de incidência;
- *Bacillus cereus*: detectado em 19% das amostras coletadas em ambientes de manipulação de alimentos (Welker *et al.*, 2009).

## 1.2 Contaminações por *E.coli* e *Samonella spp.*

*E. coli* é uma bactéria comumente encontrada nos intestinos de humanos e animais de sangue quente, onde desempenha um papel crucial na microbiota intestinal. Além de seu habitat intestinal, a *E. coli* também pode sobreviver em vários nichos ambientais, incluindo solo e água, frequentemente como um indicador de contaminação fecal devido à sua rota de transmissão fecal-oral. Foi observado que certas cepas podem persistir no ambiente por longos períodos, adaptando-se a diferentes condições.

É classificada como uma bactéria gram-negativa, pois sua estrutura de parede celular consiste em uma fina camada de peptidoglicano cercada por uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos. Durante o processo de coloração de Gram, *E. coli* retém a safranina de contracoloração, resultando em uma coloração rosa.

A *E. coli* é anaeróbia facultativa, o que significa que pode prosperar em condições aeróbicas e anaeróbicas. O crescimento ideal ocorre em torno de 37 °C, que é próximo à temperatura do corpo humano. Em condições favoráveis, como nutrientes adequados e temperaturas variando de 20 °C a 49 °C, *E. coli* pode dobrar em número aproximadamente a cada 20 minutos.

As células são tipicamente em forma de bastonete, medindo cerca de 2,0 µm de comprimento e 0,25–1,0 µm de diâmetro. A bactéria possui flagelos dispostos peritricamente, permitindo a motilidade, o que é importante para a colonização e aquisição de nutrientes em seus habitats.

Já a *Salmonella spp.* é uma bactéria gram-negativa que habita principalmente o trato intestinal de humanos e vários animais, incluindo pássaros, répteis e mamíferos. A espécie mais significativa que afeta os humanos é a *Salmonella enterica*, que inclui mais de 2.500 sorovares, com muitos sendo patogênicos. Essas bactérias são frequentemente encontradas em fontes de alimentos contaminados, como ovos, carne e laticínios, bem como no meio ambiente, particularmente no solo e na água, onde podem sobreviver por longos períodos devido à sua resiliência aos estressores ambientais.

São anaeróbias facultativas, permitindo que cresçam tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Elas prosperam em temperaturas entre 35 °C e 43 °C, com uma temperatura mínima de crescimento de cerca de 5 °C e uma máxima de aproximadamente 46 °C. A faixa de pH ideal para o crescimento é entre 7,0 e 7,5, embora possam tolerar níveis de pH de 3,8 a 9,5.

*Salmonella spp.* são tipicamente em forma de bastonete (bacilos) e medem cerca de 2 a 5 µm de comprimento e 0,7 a 1,0 µm de diâmetro. Elas possuem flagelos que permitem a motilidade, o que é crucial para a colonização dentro de hospedeiros e nichos ambientais.

### **1.3 Produção de açúcar no Brasil**

A produção de açúcar no Brasil é de extrema relevância econômica, com o país sendo o maior produtor e exportador global desse insumo. O setor é impulsionado pelo cultivo extensivo da cana-de-açúcar, que passa por várias etapas de processamento antes de resultar nos diferentes tipos de açúcar. O açúcar cristal, em particular, possui ampla aplicação industrial e exige cuidados específicos durante o transporte e armazenamento para preservar sua qualidade e atender aos rigorosos padrões internacionais. (MAPA, 2024).

A produção de açúcar envolve diversas etapas, que vão desde o cultivo da cana até a obtenção do produto final:

1. Cultivo da Cana-de-Açúcar: Após o plantio, a cana leva de 12 a 18 meses para atingir o ponto ideal de colheita.
2. Colheita: Pode ser feita de forma manual, em pequenas propriedades, ou mecanizada, predominantemente utilizada em grandes plantações.
3. Extração do Caldo: A cana colhida é transportada para as usinas, onde é triturada para extrair o caldo rico em sacarose.
4. Purificação: O caldo é tratado com cal e submetido a aquecimento, removendo impurezas indesejadas.
5. Evaporação: O caldo purificado é concentrado através da evaporação de água, resultando em um xarope espesso.

6. **Cristalização:** O xarope concentrado é resfriado e cristalizado. O açúcar cristal é separado do líquido restante (melado) por centrifugação.
7. **Secagem e Armazenamento:** Os cristais são secos, embalados e armazenados para posterior comercialização.

Embora o processo seja padronizado, variações podem ocorrer dependendo do tipo de açúcar produzido.

### 1.3.1 Tipos de Açúcar Produzidos no Brasil

No Brasil, são fabricados diferentes tipos de açúcar, cada qual com características específicas que atendem a diversas demandas:

- **Açúcar Cristal:** Com cristais grandes e transparentes. Passa por processos que removem a maior parte dos nutrientes.
- **Açúcar Refinado (Branco):** Obtido a partir do açúcar cristal, é o mais consumido, passa por refinamento adicional, resultando em um produto mais puro e sem impurezas.
- **Açúcar Mascavo:** Menos processado, mantém parte dos nutrientes naturais da cana, como ferro e cálcio. Apresenta cor marrom escura e sabor intenso.
- **Açúcar Demerara:** Similar ao mascavo, mas com cristais maiores e menor umidade. É parcialmente refinado, preservando traços de nutrientes.
- **Açúcar Orgânico:** Produzido sem pesticidas ou fertilizantes químicos, preserva as características naturais e nutrientes da cana. (Figura 1)

Apesar das variações no processamento, todos os tipos de açúcar devem ser consumidos com moderação, dado seu impacto potencial na saúde, como aumento do risco de obesidade e diabetes. Mesmo os açúcares menos processados, que retêm nutrientes, ainda são ricos em calorias e devem ser equilibrados em uma dieta saudável.

Figura 1 – Tipos de açúcares



Fonte: Policonsultas (2022).

## **1.4 Transporte de Açúcares no Brasil**

No Brasil, o transporte e armazenamento de açúcar cristal são operações realizadas por grandes empresas logísticas. Elas utilizam uma infraestrutura moderna e integrada para garantir a eficiência e segurança do produto ao longo da cadeia de suprimentos. A maior operadora ferroviária do país, administra uma malha de mais de 14 mil quilômetros, conectando importantes regiões produtoras aos principais portos brasileiros, como Santos, Paranaguá, São Francisco do Sul e Rio Grande. Essa estrutura permite a movimentação eficiente de grandes volumes de açúcar e outras commodities, promovendo competitividade no mercado internacional (Rumo, 2024).

A logística do açúcar no Brasil desempenha um papel essencial na exportação desse produto, as empresas adotam um processo estruturado que abrange desde a coleta do produto nas usinas até o embarque nos portos, com foco na eficiência, sustentabilidade e aumento de capacidade logística.

A cadeia logística do açúcar inicia-se nas usinas, localizadas principalmente no interior de São Paulo e em outras importantes regiões produtoras. O transporte inicial é realizado por caminhões, que levam o açúcar até os centros de captação. Esses centros estão estrategicamente posicionados para otimizar o fluxo logístico, permitindo o rápido encaminhamento do produto para o modal ferroviário.

O transporte ferroviário é o modal principal utilizado para movimentar grandes volumes de açúcar em longas distâncias. Essa escolha é motivada pela maior eficiência econômica e pela sustentabilidade ambiental desse modal, em comparação com o transporte rodoviário. Atualmente, o transporte ferroviário representa cerca de 15% da movimentação total de açúcar no Brasil

Após o transporte ferroviário, o açúcar é levado para terminais portuários, como os localizados em Santos e Paranaguá. Esses terminais possuem infraestrutura avançada para armazenar grandes volumes de açúcar, garantindo a preservação da qualidade do produto. O armazenamento segue padrões rigorosos de qualidade, evitando contaminações e deteriorações que possam comprometer a integridade do açúcar exportado. (RUMO, 2024).

## **1.5 Análises de qualidade do Açúcar**

A ICUMSA (*International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis*) é uma organização internacional que estabelece padrões para a análise da qualidade do açúcar e de produtos derivados da cana-de-açúcar e da beterraba. Ela define diretrizes sobre segurança,

pureza e classificação, sendo reconhecida no comércio global. A ICUMSA criou a Escala ICUMSA, que mede a cor do açúcar, variando de 0 a 10.000, com valores mais baixos indicando açúcares mais claros e puros. Além disso, a ICUMSA recomenda análises microbiológicas para garantir a qualidade e segurança alimentar, avaliando a presença de microrganismos. Seus padrões são fundamentais para a avaliação uniforme do açúcar, promovendo qualidade e segurança no setor global.

A ICUMSA classifica os açúcares em diferentes categorias, com base nas suas Unidades ICUMSA (UI), que refletem a pureza e a cor do produto. A classificação é a seguinte:

- ICUMSA 45: Este é o açúcar refinado de alta qualidade, conhecido por sua pureza e cor branca cristalina. Ele é amplamente utilizado na indústria alimentícia e de bebidas devido ao seu sabor neutro e alta solubilidade.
- ICUMSA 100: Açúcar branco padrão, com uma leve coloração em comparação ao ICUMSA 45. É adequado para muitas aplicações alimentícias.
- ICUMSA 150: Apresenta uma cor um pouco mais escura do que o ICUMSA 100, sendo utilizado em diversos produtos alimentícios.
- ICUMSA 600-1200: Representa açúcares mais escuros, frequentemente chamados de "açúcares brutos". Eles contêm mais impurezas e são usados principalmente em aplicações industriais, não sendo recomendados para consumo direto.
- ICUMSA acima de 2300: Açúcares muito escuros e não refinados, usados principalmente em processos industriais, como a produção de álcool ou ração animal.

Além da classificação pela cor, os açúcares também são avaliados com base em outros parâmetros que garantem sua qualidade (tabela 1):

- Pureza (Polarização): Refere-se à quantidade de sacarose pura presente no açúcar.
- Umidade: O nível de água no açúcar, que pode afetar sua conservação e qualidade.
- Cinzas: Indicam a presença de impurezas no produto.

Tabela 1. Principais parâmetros de qualidade do açúcar.

Classes	Tipos	Parâmetros			
		Polarização (°Z mín.)	Umidade (% máx.)	Cor ICUMSA (UI Máx.)	Cinzas Condutimétricas (% máx.)
Cristal Branco	Cristal	99,50	0,10	300(*)	0,10
	Refinado Amorfo ou Refinado	99,00	0,30	100	0,20
	Refinado Granulado	99,80	0,05	60	0,04
	Confeiteiro	99,00	0,30	150	0,20

Cristal Bruto	Demerara	96,00	1,20	5.000	0,50
	VHP	99,00	0,25	2.500	0,25
	VVHP	99,49	0,15	1.000	0,15

(\*) Admite-se até 400 UI de cor ICUMSA para o produto orgânico, certificado conforme legislação específica. (tabela, normativa 47/2018)

### 1.5.1 Relevância das Análises Microbiológicas segundo a ICUMSA GS 52 (2022)

As análises microbiológicas no açúcar e seus derivados têm como objetivo identificar e quantificar microrganismos que podem comprometer a segurança alimentar, a estabilidade do produto ou sua conformidade com os padrões internacionais. Esses testes são particularmente importantes para produtos destinados à exportação, devido à rigidez das normas de importação em mercados internacionais.

Segundo os métodos da ICUMSA, os principais parâmetros microbiológicos incluem:

- Contagem de bactérias totais: Avalia o número de bactérias presentes no produto.
- Presença de bolores e leveduras: Indicadores de contaminação que podem afetar o sabor e a qualidade do açúcar.
- Patógenos específicos: Como *Salmonella spp.* e *E coli*, que são críticos para a segurança alimentar.
- Contagem de esporos termófilos: Importante para produtos que passam por processos térmicos.

A ICUMSA define limites microbiológicos específicos para diferentes tipos de açúcar, dependendo do nível de processamento e da aplicação do produto. Por exemplo:

- O açúcar refinado, devido ao seu alto grau de purificação, deve apresentar níveis mínimos ou ausência de microrganismos.
- O açúcar bruto pode conter níveis mais altos, desde que não ultrapasse os padrões de segurança alimentar.

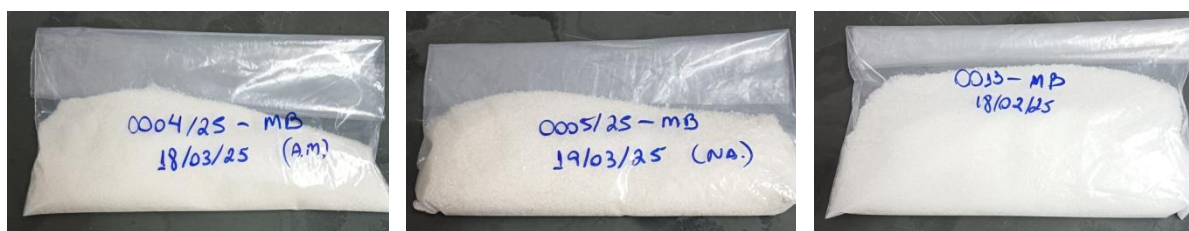
A ICUMSA desempenha um papel crucial no comércio global de açúcar, oferecendo métodos padronizados que asseguram a consistência nas análises. Suas diretrizes são amplamente reconhecidas e adotadas pelos principais mercados internacionais, o que facilita as negociações e garante que os produtos atendam às exigências regulatórias. A adesão a essas normas é essencial para a competitividade do açúcar brasileiro no mercado global, promovendo a qualidade e confiabilidade do produto.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Amostras

Foram obtidas três amostras de açúcar cristal produzidos por três usinas diferentes localizadas no estado de São Paulo, no primeiro trimestre de 2025, na etapa de armazenagem no terminal portuário, em sacos plásticos estéreis de aproximadamente 1 Kg cada, os quais foram fechados por amarração própria para evitar contaminação externa (figura 2).

Figura 2 – Amostras de açúcares



Amostra 004 /25

Amostra 0005/25

Amostra 0013/25

As amostras foram identificadas como Amostra 0004-25, Amostra 0005-25 e Amostra 0013-25, coletadas sob condições padronizadas, com o objetivo de detectar a presença de *E. Coli* e *Salmonella spp*. Os testes seguiram o protocolo ISO 6579-1:2019 para *Salmonella spp* e ICUMSA GS-52 (2022) para *E. Coli*, garantindo a confiabilidade dos resultados.

### 2.2 Análise de *Escherichia coli* (*E. coli*) - ICUMSA GS-52 (2022)

#### 2.2.1 Preparação

Antes do início das análises, a área de trabalho deve ser devidamente limpa e desinfetada para garantir a assepsia do experimento. As placas de Petri estéreis devem ser rotuladas com a identificação do meio de cultura, número da amostra e data da análise.

#### 2.2.2 Preparo das Amostras

- Para açúcar cristalino: Pesar assepticamente 25 g da amostra e transferir para um frasco de 200 mL com marca de 100 mL.
- Para açúcar líquido: Pesar a quantidade correspondente a 25 g de matéria seca.
- Adicionar água desmineralizada estéril até a marca de 100 mL e agitar até completa dissolução.
- Essa solução inicial terá uma concentração de 25 g/100 mL.

#### 2.2.3 Filtração e Incubação

1. Conectar a unidade de filtração à bomba de vácuo.
2. Caso o sistema não esteja previamente estéril, flambear o funil e a base do filtro.

3. Após resfriamento, posicionar o filtro de membrana estéril com auxílio de pinça estéril sobre a base do filtro.
4. Fixar o funil estéril e aplicar o vácuo para a filtração da amostra.
5. Desligar o vácuo e remover o funil.
6. Utilizar pinça flambada para transferir o filtro de membrana para a superfície do meio de cultura (ágar ou almofada de nutrientes), garantindo a ausência de bolhas de ar sob o filtro.
7. Incubar as placas a  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  por um período de 18 a 24 horas.
8. Placas contendo meio de ágar devem ser incubadas invertidas (tampa para baixo).

## 2.2.4 Cálculo e Expressão dos Resultados

Após a incubação, realizar a contagem das colônias:

- *E. coli* cresce formando colônias de coloração azul a violeta nos meios seletivos (*Chromocult* Ágar Coliforme - Merck, Ágar Colicromo - Dr. Möller & Schmelz e almofadas de nutrientes *Chromocult* - Sartorius Stedim).
- Bactérias coliformes aparecem em coloração salmão a vermelho.
- Contar e registrar separadamente as colônias azul/violeta (*E. coli*) e salmão/vermelho (bactérias coliformes).
- Expressar os resultados como Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por 25 g da amostra.
- Para produtos líquidos, os resultados devem ser expressos em UFC por 25 g de matéria seca.

Este procedimento garante a padronização e confiabilidade da análise microbiológica de *E. coli* em amostras de açúcar cristalino e líquido.

## 2.3 Análise se *Salmonella* – ISO/ts 6579-2:2019

Este método horizontal para detecção, enumeração e sorotipagem de *Salmonella*, segundo ISO/ts 6579-2:2019, usa a enumeração por uma técnica miniaturizada de número mais provável.

### 2.3.1 Preparação dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram preparados conforme as especificações técnicas descritas na norma, observando temperatura, pH, volumes e métodos de esterilização apropriados:

- Ágar Ureia: A solução de ureia foi adicionada sob condições assépticas à base previamente fundida e resfriada a 47–50 °C. O meio foi dispensado em tubos estéreis

(10 mL cada), solidificado em posição inclinada e armazenado a 5 °C no escuro por até três meses.

- LDC (Lisina Descarboxilase): Os componentes foram dissolvidos, pH de  $6,8 \pm 0,2$ . O meio foi dispensado em tubos de 2 a 5 mL com tampa de rosca, esterilizado a 121 °C por 15 minutos e armazenado a 5 °C por até três meses.
- TSI (Triple Sugar Iron): O meio foi preparado com pH de  $7,4 \pm 0,2$ , dispensado em tubos (30 mL), esterilizado a 121 °C por 15 minutos e solidificado em posição inclinada. Armazenado a 5 °C por até três meses.
- XLD (Xilose Lisina Desoxicolato): Dissolvido em água com aquecimento até iniciar fervura, sem autoclavar. O pH de  $7,4 \pm 0,2$  e o meio vertido em placas de Petri após resfriamento a 47–50 °C. Armazenado a 5 °C, invertido, por até quatro semanas.
- MSR/V (Ágar Rappaport-Vassiliadis Semissólido Modificado): A 1 000 mL do meio base resfriado a 47–50 °C foram adicionados asepticamente 2 mL da solução de novobiocina (10 mg/L). O pH de 5,2 (variação de 5,1 a 5,4). O meio foi dispensado em poços (2 mL) ou placas (15–20 mL), solidificado e armazenado a 5 °C por até duas semanas sem inverter.
- APT (Água Peptonada Tamponada) Dissolver os componentes na água, aquecendo (sem ferver), se necessário. O pH corresponde a  $7,0 \pm 0,2$ , a 25 °C. Dispensar 10,0 g  $\pm$  0,05 g do meio em frascos com capacidade adequada para obter as porções necessárias para o ensaio. Esterilizar na autoclave mantida a 121 °C, durante 15 min. Armazenar os frascos herméticos e fechados no escuro a 5 °C, por até seis meses.

### 2.3.2 Materiais e equipamentos

A análise foi conduzida em laboratório de microbiologia utilizando os seguintes materiais:

- Placas de microtitulação estéreis de 12 poços;
- Pipetas automáticas e multicanais com ponteiros estéreis;
- Alças de platina de 1 µL estéreis;
- Estufa bacteriológica;
- Banho-maria;
- Autoclave para esterilização;
- Estufa de secagem ou capela de fluxo laminar;
- Placas de Petri estéreis (90 mm);
- Tubos de ensaio com tampas rosqueáveis;
- Meios de cultura descritos na seção 5.2 da ISO/TS 6579-2:2019.

### 2.3.3 Etapas do método miniaturizado

#### 2.3.3.1 Suspensão inicial da amostra

- Preparar a suspensão inicial diluindo a alíquota de ensaio em uma proporção de 1:10 em água peptonada tamponada (APT).
- Por exemplo, adicionar 25 g da amostra a 225 mL de APT e homogeneizar.

### **2.3.3.2 Diluição e pré-enriquecimento em meio líquido não seletivo**

- Utilizar uma placa de microtitulação de 12 poços, com a primeira fileira (três poços) vazia, e as demais (segunda, terceira e quarta fileiras) contendo 2 mL de APT por poço.
- Transferir 2,5 mL da suspensão inicial para cada poço da primeira fileira, utilizando uma pipeta.
- Transferir 0,5 mL de cada poço da primeira fileira para os poços correspondentes da segunda fileira, contendo 2 mL de APT (primeira diluição:  $5^{-1}$ ), utilizando, por exemplo, uma pipeta multicanal.
- Transferir 0,5 mL de cada poço da segunda fileira para os poços da terceira fileira, também com 2 mL de APT (segunda diluição:  $5^{-2}$ ), utilizando ponteiras novas.
- Antes da transferência da segunda para a terceira fileira, misturar as suspensões nos poços aspirando e dispensando cuidadosamente o líquido com a pipeta.
- Repetir o mesmo procedimento para as demais fileiras, se necessário.
- Incubar a placa de microtitulação a 37 °C por 18 horas  $\pm$  2 horas.

### **2.3.3.3 Enriquecimento seletivo em meio semissólido**

- Permitir que o meio MSR/V presente nas placas de microtitulação atinja a temperatura ambiente, caso tenha sido armazenado em temperatura mais baixa.
- Inocular cada poço contendo 2 mL de MSR/V com 20  $\mu$ L da cultura em APT, utilizando, por exemplo, uma pipeta multicanal com ponteiras novas para cada fileira de três poços.
- Depositar a alíquota de 20  $\mu$ L na borda e superfície do poço, evitando a movimentação excessiva das partículas da amostra.
- Manipular as placas com cuidado, evitando agitação que possa afetar os resultados.
- Incubar as placas de MSR/V inoculadas a 41,5 °C por 24 horas  $\pm$  3 horas.
- Não inverter as placas durante a incubação.
- Poços suspeitos apresentam uma zona turva cinza-branca, que se estende a partir do ponto de inoculação, com um halo branco de bordas bem definidas.
- Caso os poços estejam negativos após 24 horas, reincubar por mais 24 horas  $\pm$  3 horas.

### **2.3.3.4 Plaqueamento seletivo**

- Permitir que as placas de ágar XLD atinjam a temperatura ambiente antes do uso, caso tenham sido armazenadas sob refrigeração. Se necessário, secar a superfície das placas.
- Subcultivar os poços suspeitos do MSR/V utilizando uma alça de 1  $\mu$ L, mergulhando na região mais turva e inoculando na superfície de uma placa XLD, de modo a obter colônias bem isoladas.
- Priorizar o repique das maiores diluições, ou seja, aquelas com três poços suspeitos de MSR/V, bem como as subseqüentes com dois ou um poço suspeito.
- Incubar as placas XLD invertidas a 37 °C por 24 horas  $\pm$  3 horas.
- Retornar as placas de MSR/V negativas à incubadora a 41,5 °C por mais 24 horas  $\pm$  3 horas, se necessário.
- Caso novos poços se tornem suspeitos após 48 horas, realizar novamente o plaqueamento seletivo.

- Colônias típicas de *Salmonella* spp. no ágar XLD apresentam centro preto com halo translúcido de coloração avermelhada, devido à mudança do indicador.

#### 2.3.3.5 Confirmação bioquímica e sorológica

- Efetuar a confirmação a partir de pelo menos uma colônia suspeita bem isolada de cada placa XLD.
- Se não for possível obter colônias isoladas, realizar nova semeadura em ágar XLD ou em meio não seletivo (por exemplo, ágar nutriente), a fim de obter colônias puras.
- Se todas as colônias analisadas não forem confirmadas como *Salmonella* spp. recomenda-se investigar os poços de MSRV presuntivamente positivos que ainda não tenham sido subcultivados (em menores diluições).
- Kits comerciais confiáveis podem ser utilizados para a confirmação bioquímica, desde que usados conforme as instruções do fabricante.
- Nota: O reconhecimento de colônias de *Salmonella* spp. requer experiência, pois sua aparência pode variar de acordo com o sorovar, lote do meio de cultura e indicador utilizado.

#### 2.3.3.6 Seleção de colônias para confirmação

- Selecionar pelo menos uma colônia típica ou suspeita de cada placa XLD para confirmação.
- Se disponíveis colônias bem isoladas em meio seletivo, a confirmação bioquímica pode ser feita diretamente, sem repique.
- Em contextos rotineiros, a etapa de repique pode ser omitida, desde que tecnicamente justificado.
- A verificação da pureza pode ser realizada diretamente no meio seletivo.
- Incubar as placas de ágar nutriente inoculadas a 37 °C por 24 horas ± 3 horas.
- Utilizar culturas puras para os testes de confirmação bioquímica e sorológica.

#### 2.3.3.7 Confirmação bioquímica

- Com auxílio de uma alça de inoculação, transferir colônias suspeitas do ágar XLD para os meios indicados: TSI, ureia e LDC.

##### *Ágar TSI*

- Estriar a superfície inclinada do tubo e perfurar o fundo com a alça.
- Incubar a 37 °C por 24 horas ± 3 horas.

Interpretar as mudanças no meio, conforme Quadro 1:

Quadro 1. Mudanças na cor do meio e respectiva interpretação.

Local	Cor	Interpretação
<b>Fundo do tubo</b>	amarelo	glicose positiva (glicose usada)
	vermelho ou inalterado	glicose negativa (glicose não usada)
	preto	formação de sulfeto de hidrogênio
	bolhas ou rachaduras	formação de gás a partir de glicose
<b>Superfície inclinada do ágar</b>	amarelo	lactose e/ou sacarose positiva (lactose e/ou sacarose usadas)
	vermelho ou inalterado	lactose e sacarose negativa (nem lactose nem sacarose usadas)

Fonte: ISSO 6579-2:2019

Culturas típicas de *Salmonella* spp. apresentam superfície inclinada do ágar alcalina (vermelha) e fundo do tubo ácido (amarelo) com formação de gás (bolhas) e (em cerca de 90% dos casos) formação de sulfeto de hidrogênio (escurecimento do ágar)

Uma variante positiva para lactose de *Salmonella* spp. desenvolve cor amarela na superfície inclinada do TSI. Assim, a confirmação preliminar das culturas de *Salmonella* não pode se basear apenas nos resultados do teste de ágar TSI.

#### *Ágar ureia*

- Estriar a superfície inclinada do ágar com uma alça de inoculação.
- Incubar a 37 °C por 24 horas ± 3 horas, realizando observações em intervalos regulares.
- Em caso de reação positiva, a ureia é hidrolisada, liberando amônia, o que provoca a mudança da cor do indicador vermelho de fenol de amarelo para rosa-pink, evoluindo para um tom cereja intenso.
- Normalmente, essa alteração de cor é perceptível entre 2 e 4 horas após o início da incubação.
- Culturas típicas de *Salmonella* spp. não hidrolisam a ureia, mantendo, portanto, a coloração original do meio inalterada.

#### *Meio de Descarboxilação de L-lisina (LDC)*

- Inocular o meio próximo à superfície do líquido.
- Incubar a 37 °C por 24 horas ± 3 horas.

A turbidez e a coloração púrpura após a incubação indicam uma reação positiva. Já a coloração amarela indica uma reação negativa.

A maioria das culturas típicas de *Salmonella* apresenta reação positiva neste teste.

### Interpretação dos Testes Bioquímicos

*Salmonella spp.* geralmente apresenta os perfis de reação descritos no Quadro 2. Se essas reações forem observadas, pode-se considerar que a amostra possivelmente contém *Salmonella spp.*.

Quadro 2 – Interpretação dos ensaios bioquímicos - reações típicas da maioria dos sorotipos de *Salmonella*, com as respectivas porcentagens de ocorrência indicadas entre parênteses.

Local	Cor	Interpretação
	amarelo	glicose positiva (100 %)
Fundo do tubo	preto	formação de sulfeto de hidrogênio, H <sub>2</sub> S (91,6 %)
	bolhas e/ou rachaduras	formação de gás a partir de glicose (91,9 %)
Superfície inclinada do ágar	vermelho ou inalterado	lactose e/ou sacarose negativa (respectivamente, 99,2 % e 99,5 %)
	amarelo, sem mudança de cor do meio	negativo (100 %)
	cor púrpura e turbidez	positivo (94,6 %)

Fonte: ISO 6579-2:2019

### 2.3.3.8 Confirmação sorológica e sorotipagem

Resultados de testes bioquímicos podem indicar se um isolado pertence ao gênero *Salmonella*. Para uma tipificação completa das cepas de *Salmonella*, a sorotipagem também tem que ser realizada. A confirmação sorológica fornece informação adicional sobre qual sorogrupo pertence o isolado. Com a confirmação sorológica é possível tipificar o isolado em nível de sorovar. Para mais detalhes, ver a ISO 6579.

### 2.3.3.9 Expressão dos resultados

Contar o número de poços dando uma reação positiva confirmada para cada diluição. Calcular o NMP do número de poços positivos confirmados em cada diluição.

Se todos os poços forem negativos, mas na suspensão inicial (10<sup>-1</sup> de diluição) for encontrada *Salmonella spp.* positiva (após confirmação), o resultado pode ser reportado como: *Salmonella spp.* presente na quantidade de amostra ensaiada (por exemplo, 25 g), mas menor do que o limite inferior de detecção do método mini-NMP (<1 UFC/g).

Para o cálculo do NMP, um programa de *software* para uso no Excel<sup>1</sup> foi criado e pode lidar com até 10 níveis de diluições em série, é altamente recomendado que este programa seja

usado em vez de outros programas. O *software* está disponível gratuitamente para download em: <http://standards.iso.org/iso/ts/6579/-2/>

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise microbiológicas das três amostras de açúcar cristal estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da análise microbiológica das amostras de açúcar cristal.

Amostra	<i>E.coli</i> (UFC/g)	<i>Salmonella spp</i> (Presença/Ausência)
0004/25	0	Ausência
0005/25	0	Ausência
0013/25	0	Ausência

Legenda: UFC/g = Unidades Formadoras de Colônias por grama.

#### 3.1 *Salmonella spp*

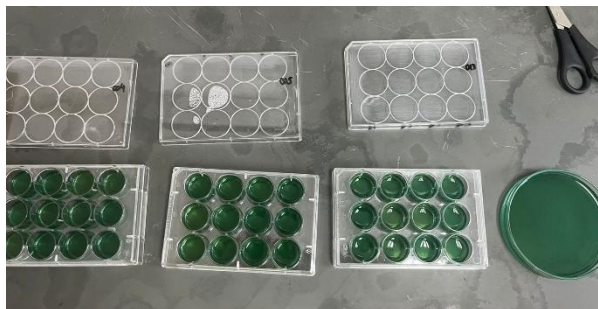
A figura 3 mostra o 1º passo, com a suspensão inicial realizada, e a mesma suspensão após 18 horas de incubação, no qual aparecem os poços suspeitos

Figura 3 – Suspensão inicial com *Salmonella spp* e após a incubação de 18 horas (poços suspeitos identificados)



A figura 4 mostra o 2º passo, com o meio MRSV inoculado após 24h de incubação. Foi verificado que os poços não tiveram alterações aparentes.

Figura 4 – Meio MRSV inoculado, após a incubação de 24 horas.



### 3.2 *E. coli*

Nas amostras filtradas em membranas, após 24h de incubação, foi constatado que não houve nenhum crescimento de colônias aparentes (figura 5).

Figura 5 – Amostras filtradas, membranas após 24h de incubação.



Os resultados demonstraram ausência de *Salmonella spp.* e 0 UFC/g de *E. coli* nas três amostras de açúcar cristal analisadas, atendendo integralmente aos parâmetros microbiológicos da RDC ANVISA nº 331/2019, que exige ausência de *Salmonella spp.* em 25 g e limite de  $\leq 1$  UFC/g para *E. coli* seguindo ao padrão ICUMSA GS-52 (2022).

Essa conformidade sugere que os processos de refinamento, higienização e armazenamento do produto foram eficazes na eliminação de patógenos, corroborando com o que foi abordado nesse estudo.

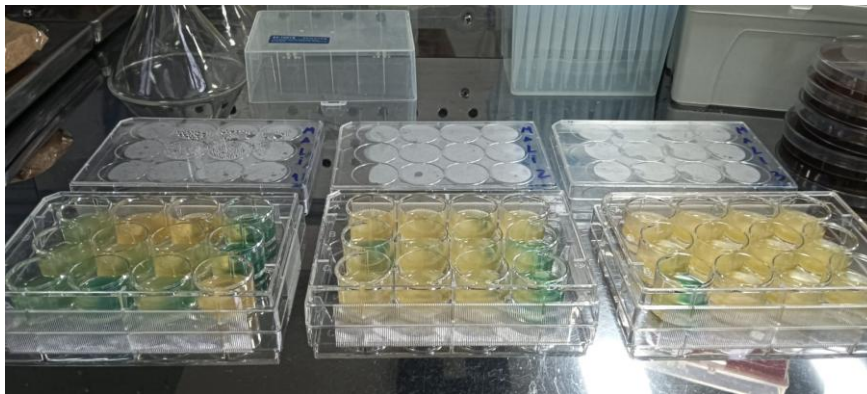
Na análise de *Salmonella ssp* não houve a necessidade de seguir todos os passos, pois na etapa do MRSV já foi constatada sua ausência.

### 3.3 Testes comparativos com cepas certificadas (positividade)

Foram realizadas as mesmas análises com cepas certificadas de *E. coli* e *Salmonella spp.* para demonstração de resultados positivo, a fim de comparação com os resultados negativos obtidos nas três amostras estudadas.

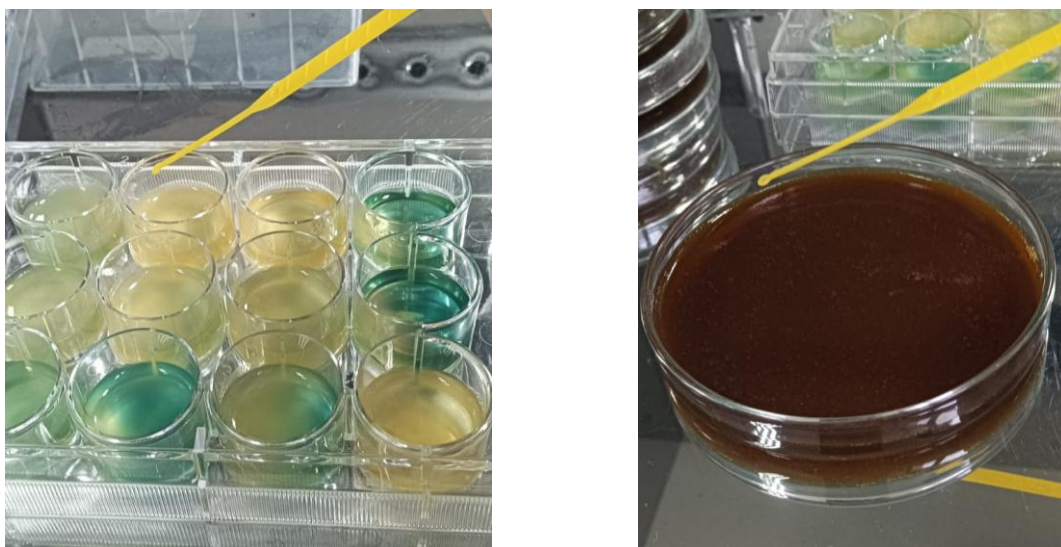
A figura 6 apresenta os resultados de positividade (poços esverdeados), denominados poços suspeitos, para as cepas certificadas, em meio MRSV.

Figura 5 – Amostras filtradas, membranas após 24h de incubação.



Desta maneira, inoculamos de poços suspeito a cada diluição, para estriar no meio de cultura XLD, para esperarmos o crescimento da bactéria (figura 6).

Figura 6 – Obtenção de amostra de poços suspeitos e sementeira, em estrias, no meio XLD.





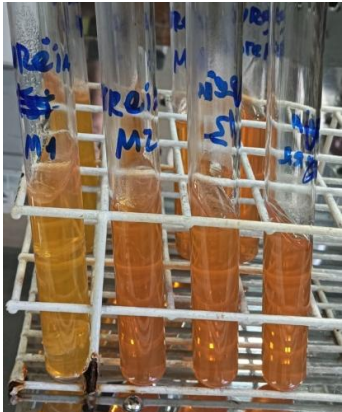
Após o período de incubação, observou-se o desenvolvimento bacteriano, com a formação de pontos escuros que indicam colônias isoladas suspeitas de *Salmonella spp* (figura 7) No entanto, nesta fase ainda não é possível confirmar definitivamente a presença do patógeno específico. Para tal confirmação, é realizado o teste bioquímico, que fornece a identificação conclusiva.

Figura 7 – Crescimento de colônias isoladas suspeitas de *Salmonella spp.*



Na etapa final de confirmação, foram utilizados três meios de cultura distintos para interpretação dos resultados (figura 8), conforme protocolo padrão. Todos os testes foram realizados em triplicata, com inclusão adicional de um tubo de ensaio controle para verificação de esterilidade dos meios utilizados.

Figura 8 – Confirmação de positividade em meios de cultura diferentes.

LDC	TSI	Ágar Ureia:
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Negativo: tubo violeta com turbidez</li> <li>• Positivo: dois tubos amarelos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo: Coloração preta com superfície rosa + manchas pretas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo: Mudança de cor: amarelo → laranja</li> <li>Alteração física: rachaduras no meio.</li> </ul>

#### 4. Conclusão

Este estudo avaliou a segurança microbiológica do açúcar cristal destinado à exportação, com foco na detecção de *E. coli* e *Salmonella spp.* em amostras transportadas por vagões e carretas. Os resultados demonstraram ausência de *Salmonella spp.* e 0 UFC/g de *E. coli* nas três

amostras analisadas, indicando conformidade com os padrões da ANVISA nº 331/2019 e refletindo a eficácia dos processos produtivos.

A ausência desses patógenos, mesmo após o transporte, sugere que as condições logísticas (como armazenamento em ambientes secos e vedados) foram adequadas para preservar a qualidade microbiológica. Esses achados corroboram estudos prévios, com este estudo, que atribuem a segurança do açúcar cristal à sua baixa susceptibilidade à contaminação pós-processamento.

Embora as amostras analisadas tenham atendido aos requisitos legais, a complexidade da cadeia logística exige vigilância constante. A implementação de estratégias preventivas (ex.: treinamento de manipuladores, uso de embalagens hermeticamente fechadas) é essencial para mitigar riscos em cenários de maior vulnerabilidade. Este estudo contribui para a literatura ao validar a eficácia dos controles existentes, mas ressalta que a inovação em embalagens e transporte pode ser um diferencial para garantir a segurança em larga escala.

#### **4.1 Contribuições e Recomendações:**

##### **4.1.1 Para a Indústria:**

- Reforçar a monitoria contínua em etapas críticas (ex.: carga/descarga) para evitar contaminação cruzada;
- Investigar a rastreabilidade de matérias-primas, já que a contaminação inicial pode originar-se do solo.

##### **4.1.2 Para Pesquisas Futuras:**

- Ampliar o número de amostras e incluir outros indicadores (ex.: bolores, leveduras) para uma avaliação mais abrangente;
- Estudar o impacto de condições climáticas extremas (ex.: umidade durante o transporte) na qualidade microbiológica.

##### **4.1.3 Para a Saúde Pública:**

Os resultados reforçam a segurança do açúcar cristal exportado, mas destacam a necessidade de padronização global de critérios microbiológicos para evitar barreiras comerciais.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 326, DE 30 DE JULHO DE 1997.

DEWI, R. T. K.; ELFRIEDE, D. P.; LAI, F., S. Food Safety Aspects of Palm Sugar: The Authentic Local Sweetener from Baduy Tribe, Indonesia. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, 27 nov. 2023. Disponível em: <https://jfqhc.ssu.ac.ir/article-1-1065-en.pdf>. Acesso em: 20 maio 2025.

EMBRAPA. **Boas Práticas de Fabricação (BPF)**. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/> Acesso em: 10 fev. 2025.

ISO. **Microbiologia de Alimentos**. ISO/ts 6579-2:2019. Disponível em: <https://www.icumsa.org/>. Acesso em: 10 fev. 2025.

OMS. Organização mundial da Saúde. Disponível em: <https://www.who.int/>. Acesso em: 22 abr. 2025.

WELKER1 et al. **Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010.

OLIVEIRA, C. **Controle microbiológico do açúcar cristal**. 2010.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 47/2018 06/09/2018**.

Policonsultas. **Conheça as diferenças entre os diversos tipos de açúcar**. 29 julho 2022. Disponível em: <https://policonsultas.com.br/conheca-as-diferencas-entre-os-diversos-tipos-de-acucar/>. Acesso em: 15 jun. 2025.