



Contaminação fúngica em sucos de cana-de-açúcar comercializados em Teresina, Piauí, Brasil

Fungal contamination in sugarcane juices commercialized in Teresina, Piauí, Brazil.

Contaminación por hongos en jugos de caña de azúcar vendido en Teresina, Piauí, Brasil

Jhonatas Cley Santos Porto¹, Kaline Soares da Costa², Ivonizete Pires Ribeiro³, André Luis Souza dos Santos⁴,
Liliane Maria Soares Martins⁵, Mitra Mobin⁶

RESUMO

Objetivo: verificar a presença de fungos em sucos de cana-de-açúcar vendidos em lanchonetes de Teresina-PI e testar métodos de sanitização alternativos para eliminar estes microrganismos nos colmos da cana-de-açúcar. **Métodos:** Trinta sucos de cana-de-açúcar e 28 colmos de cana-de-açúcar foram obtidos de 30 lanchonetes escolhidas randomicamente. A sanitização dos colmos foi realizada por imersão em soluções de vinagre 50% ou hipoclorito de sódio 1% durante 5 e 15 min. As amostras coletadas dos sucos e dos colmos foram inoculadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol e as espécies foram identificadas por métodos fenotípicos. **Resultados:** No total, 102 fungos foram isolados de todos os sucos pesquisados, sendo *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *Candida albicans* as espécies mais frequentes. A sanitização com hipoclorito de sódio 1% mostrou-se eficiente na eliminação dos fungos dos colmos. **Conclusão:** Todos os fungos identificados são patógenos oportunistas e oferecem risco elevado à saúde pública. A sanitização do colmo da cana-de-açúcar por imersão em hipoclorito de sódio 1% foi eficiente na eliminação desta contaminação.

Descritores: Contaminação de Alimentos; Fungos; Higiene dos Alimentos.

ABSTRACT

Aim: to verify the presence of fungi in sugarcane juice sold in snack bars of Teresina-PI and to test alternative sanitization methods to eliminate these microorganisms in sugarcane stalks. **Methods:** Thirty sugarcane juice and 28 sugarcane stalks were obtained from 30 randomly chosen snack bars. The sanitization of the stalks was performed for immersion in 50% vinegar or 1% sodium hypochlorite solutions during 5 and 15 min. The samples collected from the juices and the stalks were inoculated into Sabouraud agar with Chloramphenicol and the species were identified by phenotypical methods. **Results:** In total, 102 fungi were isolated from all researched juice, with *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* being the most frequent species. The sanitization with 1% sodium hypochlorite proved to be efficient to the elimination of fungi of the stalks. **Conclusion:** All the identified fungi were opportunistic pathogens and offer an elevated risk to public health. The sanitization from sugarcane stalks by immersed in 1% sodium hypochlorite were efficient in elimination this contamination.

Descriptors: Food Contamination; Fungi, Food Hygiene.

RESUMEN

Objetivo: verificar la presencia de hongos en los jugos de la caña de azúcar comercializados en las cafeterías de Teresina-PI y probar métodos alternativos de saneamiento para eliminar estos microorganismos en los culmos de la caña de azúcar. **Métodos:** Se obtuvieron 30 jugos de caña de azúcar y 28 culmos de caña de azúcar de 30 barras de bocadillos elegidas al azar. La higienización de los culmos se realizó por inmersión en soluciones de vinagre al 50% o hipoclorito de sodio al 1% durante 5 y 15 min. Las muestras recolectadas de jugos y culmos se inocularon en agar Sabouraud con cloranfenicol y las especies se identificaron por métodos fenotípicos. **Resultados:** En total, se aislaron 102 hongos de todos los jugos investigados, siendo *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* y *Candida albicans* las especies más frecuentes. La desinfección con hipoclorito de sodio al 1% demostro ser eficaz en la eliminación de hongos de los culmos. **Conclusión:** Todos los hongos identificados eran patógenos oportunistas y presentan un alto riesgo para la salud pública. La desinfección del culmo de la caña de azúcar mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 1% fue eficaz para eliminar esta contaminación.

Descriptores: Contaminación de Alimentos; Hongos; Higiene Alimentaria.

¹Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Teresina (PI), Brasil. E-mail: jhonatas_porto@hotmail.com

²Centro Universitário UNINOVAFAPI, Departamento de Biomedicina, Teresina (PI), Brasil. E-mail: kallnutri@yahoo.com.br

³Centro Universitário UNINOVAFAPI, Departamento de Enfermagem, Teresina, (PI), Brasil: ivonizete.ribeiro@uninovafapi.edu.br

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia, Rio de Janeiro (RJ), Brasil. E-mail: andre@micro.ufrj.br

⁵Universidade Estadual do Piauí, Departamento de Microbiologia, Teresina (PI), Brasil. E-mail: liliane-martins@uol.com.br

⁶Centro Universitário UNINOVAFAPI, Departamento de Odontologia, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: mitra_mobin@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Alimentos sólidos e líquidos contaminados com microrganismos patogênicos são responsáveis por aproximadamente 1,9 milhão de mortes em todo o mundo anualmente, especialmente em países em desenvolvimento. Entre os vários fatores que contribuem para essa triste estimativa está a higiene inadequada ou inexistente em toda a cadeia alimentar, principalmente nos alimentos vendidos nas ruas (NONGA et al., 2015). Uma das comidas de rua mais consumidas no Brasil é o suco da cana-de-açúcar, também conhecido como garapa ou caldo de cana, muito consumido na região nordeste do Brasil, principalmente nos períodos mais quentes do ano. Esta bebida é extraída naturalmente da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), apresenta alto valor nutricional e é considerada saborosa pelos consumidores (DE CARVALHO; DE MARGALHÃES, 2007; OKOJIE; ISAH, 2014).

O processo de produção do suco da cana-de-açúcar não utiliza procedimentos industrializados sofisticados e as condições higiênico-sanitárias relacionadas à produção e comercialização desse produto são muitas vezes negligenciadas (BANSAL et al., 2016). A ausência de condições higiênico-sanitárias adequadas do processo produtivo à comercialização desta bebida em conjunto com às características físico-químicas

e climáticas da região Nordeste brasileira, levam à fácil contaminação deste produto por diferentes classes de microrganismos, especialmente fungos (DE SOUZA et al., 2017). A contaminação do caldo da cana por fungos gera um grande problema econômico devido à produção de sabores e odores desagradáveis. Além disso, o suco da cana-de-açúcar contaminado por esses microrganismos é um problema de saúde pública, uma vez que algumas espécies de fungos podem desenvolver micotoxicoses humanas de grande variedade, podendo ser fatal (SOUZA et al., 2013).

De modo a garantir a qualidade microbiológica do suco da cana-de-açúcar e proteger a saúde do consumidor, a higienização da cana e as práticas higiênicas em todas as etapas da fabricação dessa bebida são elementos fundamentais para a segurança alimentar. A eficácia de vários sanitizantes já foi testada para esse fim; entretanto, eles foram limitados à ação antibacteriana (NUNES et al., 2010).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a contaminação fúngica do suco da cana-de-açúcar comercializado em lanchonetes localizadas em Teresina, capital do estado do Piauí, bem como testar métodos alternativos de sanitização para eliminar essa contaminação em colmos de cana-de-açúcar.

METODOLOGIA

Este é um estudo quantitativo observacional que foi realizado entre fevereiro e junho de 2019, na cidade de Teresina, capital do Estado do Piauí, Brasil.

Trinta caldos de cana-de-açúcar in natura e 28 colmos de cana-de-açúcar foram obtidos comercialmente em trinta lanchonetes escolhidas ao acaso. Os colmos foram armazenados em sacos plásticos estéreis, enquanto os caldos foram transferidos para um recipiente de coleta estéril e mantidos sob refrigeração (4 °C). Em seguida, os

caldos e os colmos foram encaminhados para o laboratório de pesquisas do Centro Universitário de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí (UNINOVAFAPI), onde foram devidamente processados.

As amostras de suco de cada estabelecimento foram diluídas em água peptonada 0,1% (Laborclin, PR, Brasil) nas concentrações de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Em seguida, 100 µl de cada diluição foram inoculados em placas de Petri contendo ágar Batata Dextrose (BD

Difco, NJ, EUA) mais cloranfenicol 0,05 g/L (INLAB, São Paulo, Brasil). Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas à temperatura ambiente por 48 horas (crescimento de leveduras) ou 72h (crescimento de fungos filamentosos).

Em relação à sanitização do colmo da cana-de-açúcar, utilizamos soluções de vinagre 50% ou hipoclorito de sódio 1% obtidas a partir da diluição de vinagre alcoólico (Maratá, Sergipe, Brasil) e hipoclorito de sódio (Nutrilar, Maranhão, Brasil) em água destilada, respectivamente. Os 28 colmos foram divididos igualmente em quatro grupos, de forma que àqueles pertencentes ao Grupo I e ao Grupo II foram imersos em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 e 15 minutos, respectivamente. Já os colmos do Grupo III e Grupo IV foram imersos em solução de vinagre 50% por 5 e 15 minutos, respectivamente.

Posteriormente, os 28 colmos foram lavados separadamente com água destilada e as amostras foram coletadas dos colmos usando swabs estéreis embebidos em solução salina 0,85% e, de cada amostra, foram transferidos 100 µl para placas de Petri contendo ágar Batata Dextrose mais cloranfenicol 0,05 g/L. As placas inoculadas foram incubadas nas mesmas condições de

temperatura e tempo descritas anteriormente (48 h para leveduras e 72h para fungos filamentosos). Todo o procedimento foi realizado em duplicata.

Após o crescimento fúngico, unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) foram determinadas (ANDRADE et al., 2008). Microcultivo das colônias filamentosas foram preparadas para permitir a observação de estruturas fúngicas e posterior identificação das espécies de acordo com as chaves de identificação descritas anteriormente (DE HOOG et al., 2000). As leveduras foram isoladas em meio CHROMagar Candida (CHROMagar, França) e identificadas pela observação da cor e morfologia da colônia seguindo as instruções do fabricante. Microcultivo em ágar fubá e teste do tubo germinativo foram usados como um método de identificação adicional das espécies de levedura (ANVISA, 2010).

A análise estatística foi realizada por meio do programa BioEstat (versão 5.3). Foram calculadas as frequências absoluta (n) e relativa (N), enquanto o teste T para amostras independentes com nível de significância de 5% foi aplicado para aceitação ou rejeição da hipótese nula.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os sucos de cana-de-açúcar adquiridos estavam contaminados e 102 fungos (98 leveduras e 4 fungos filamentosos) foram identificados. As seguintes espécies foram isoladas: *Candida guilliermondii* (n = 38; N = 37%), *Candida tropicalis* (n = 31; N = 30%), *Candida albicans* (n = 18; N = 18%), *Candida krusei* (n = 8; N = 8%), *Aspergillus niger* (n = 4; N = 4%) e *Candida haemulonii* (n = 3; N = 3%). As contagens de fungos variaram de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL a $3,3 \times 10^4$ UFC/mL, com metade das lanchonetes apresentando UFC maior que 10^4 .

Os fungos são microrganismos ubíquos que apresentam extraordinária adaptabilidade a

diferentes condições ambientais, principalmente devido à sua plasticidade genética e bioquímica (ZAITZ et al., 2010). No entanto, para que estes microrganismos se desenvolvam em substratos, como o suco da cana-de-açúcar, algumas condições devem ser respeitadas, tais como: suscetibilidade do substrato, característica da colonização da espécie, temperatura, alta umidade relativa do ar durante o armazenamento e/ou transporte de alimentos e pH. Desses fatores, temperatura (22-30 °C) e umidade relativa do ar (>30%) são considerados os fatores mais influentes na contaminação fúngica dos substratos (ANDRADE et al., 2008).

Embora seja esperado que o suco de cana-de-açúcar apresente uma quantidade significativa de fungos devido aos colmos da cana-de-açúcar utilizadas em sua fabricação, os valores limites desses microrganismos nesta bebida foram definidos no Brasil por meio de Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 2001. De acordo com essa resolução, os sucos de cana-de-açúcar devem conter uma carga fúngica inferior a 10^4 UFC/mL, sendo que UFC maiores tornam essa bebida imprópria para o consumo humano (BRASIL, 2001). Assim, metade dos sucos de cana avaliados neste estudo eram incompatíveis para consumo humano, pois apresentavam UFCs acima de 10^4 UFC/mL.

Leveduras e fungos filamentosos podem crescer em condições de baixo pH (4,5 - 5,5) e altas concentrações de açúcar (acima de 85%); no entanto, estudos têm demonstrado que as leveduras são contaminantes dos alimentos mais comuns do que os fungos filamentosos e podem ter uma carga microbiana de até $6,61 \times 10^6$ UFC/mL maior do que os fungos filamentosos (ANEJA et al., 2014; XU et al., 2015). Esse fato explicaria a frequência significativamente maior de leveduras sobre os fungos filamentosos observada na presente pesquisa.

Todas as espécies fúngicas aqui identificadas são capazes de causar doenças de gravidade variada em humanos e outros animais, seja de forma direta ou por meio de seus metabólitos secundários, também conhecidos como micotoxinas. Estas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos, por meio dos quais a inalação, o contato e principalmente, a ingestão provocam doenças ou mesmo a morte (ZAITZ et al., 2010; VYLKOVA, 2017).

Nesse contexto, *Aspergillus niger*, o único fungo filamentoso identificado no presente estudo, produz de forma consistente uma toxina nefrotóxica, imunossupressora, carcinogênica e teratogênica, conhecida como ocratoxina. Essa

micotoxina tem alta resistência a agentes químicos e biológicos e pode ser encontrada em carnes e outros derivados de animais que se alimentaram de alimentos contaminados com a ocratoxina (DE SOUZA et al., 2017).

Sobre *Candida guilliermondii*, a espécie mais prevalente nesta pesquisa, não foram encontrados relatos de toxina produzida por esta espécie. No entanto, essa levedura é comumente encontrada no caldo da cana-de-açúcar e pode eventualmente ser isolada do caldo já fermentado, principalmente devido à sua alta competitividade por compostos ricos em nitrogênio e carbono (MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015; ABDEL-SATER et al., 2017). Além disso, esta levedura é responsável por candidíase invasiva grave em indivíduos imunocomprometidos (AHANGARKAN et al., 2019).

As leveduras são saprofíticas e podem ser isoladas do solo, plantas ou matéria orgânica em decomposição, além de fazerem parte da microbiota humana (MARIA, 2020). Dessa forma, pode ocorrer contaminação fúngica do suco e do colmo da cana-de-açúcar desde a coleta até o manuseio final. Além disso, um estudo avaliou a influência da temperatura na qualidade microbiológica e físico-química da cana-de-açúcar e concluiu que o colmo armazenado em temperatura ambiente apresenta os maiores níveis de contaminação, principalmente por levedura (ANDRADE et al., 2008).

Infelizmente, os resultados relacionados à contaminação por fungos no suco da cana-de-açúcar são escassos e muitas vezes limitados à identificação do gênero ou simplesmente apenas ao grupo fúngico (levedura ou fungos filamentosos), o que torna a comparação com nossos achados significativamente mais difícil.

Em relação à sanitização do colmo da cana-de-açúcar, não houve crescimento de fungos apenas pelo método de imersão em hipoclorito de sódio 1% por 15 min, como mostra a tabela 1. É importante ressaltar que as leveduras foram mais

suscetíveis às soluções testadas que os fungos filamentosos, apesar da análise estatística não ter encontrado associação significativa entre o grupo de fungos e o método de sanitização testado ($P \geq 0,05$).

Sobre os agentes sanitizantes utilizados neste trabalho, somente o hipoclorito de sódio 1% apresentou atividade antifúngica eficaz quando aplicado por 15 minutos. Esses achados estão de acordo com os resultados de Aquino et al. (2016), que também encontraram uma evidente atividade antifúngica de hipoclorito de sódio 1% contra fungos isolados de leitos hospitalares.

Estudos fitopatológicos publicados indicam que a maior a concentração de hipoclorito de sódio pode resultar em tempos de ação mais curtos. No entanto, quanto maior a concentração deste desinfetante maior a taxa residual de cloro livre, o que pode comprometer significativamente a característica físico-química da cana e

inviabilizar o seu consumo (RENUKA et al., 2016). Quanto à solução de vinagre, há evidências de forte atividade antifúngica dessa substância quando pura e testada em células planquitônicas (CASTRO et al., 2015).

Portanto, medidas que minimizem a contaminação fúngica dessa bebida tão apreciada no Brasil devem ser consideradas prioritárias. A higienização de equipamentos e colmos de cana-de-açúcar somados à implantação de boas práticas de fabricação, a aplicação de treinamentos aos vendedores ambulantes e a fiscalização mais efetiva dos estabelecimentos comerciais são ações que podem minimizar a contaminação do suco da cana-de-açúcar, não só por fungos, mas também por outros microrganismos (OKOJIE; ISAH, 2014).

Tabela 1. Sanitização por imersão de colmos de cana-de-açúcar para eliminação de contaminação fúngica.

Solução	Tempo de contato	
	5 min	15 min
Hipoclorito de sódio 1%	Colônias filamentosas	Sem crescimento
Vinagre 50%	Colônias filamentosas e leveduriformes	Colônias filamentosas

CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmam que todos os sucos de cana-de-açúcar examinados estavam contaminados por fungos oportunistas e metade destes sucos eram impróprios para o consumo humano, conforme as normativas do ministério da saúde brasileiro.

Portanto, este estudo sugere a sanitização do colmo da cana-de-açúcar por imersão em

solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos como medida preventiva complementar da contaminação fúngica do suco da cana-de-açúcar e reforça a necessidade de uma política sanitária mais rigorosa sobre a qualidade microbiológica destes sucos comercializados em Teresina, Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SATER, M. A.; MOUBASHER, A. H.; ZEINAB, S. M. Diversity of yeasts and filamentous fungi in five fresh fruit juices in Egypt. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**. v. 7, n. 4, p. 356-386, 2017.
- AHANGARKANI, F. et al. Candidemia due to *Candida guilliermondii* in an immunocompromised infant: a case report and review of literature. **Current Medical Mycology**. v. 5, n. 1, p. 32-36, 2019.
- ANDRADE, S. R. R.; PORTO, E.; SPOTO, M. H. F. Evaluation of the quality of the juice extracted of pieces of fresh cut sugar cane stored under different temperatures. **Food Science and Technology**, v.28, p. 51-55. 2008.
- ANEJA; K. R. et al. Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. **International Journal of Microbiology**. v.2014, p.1-14, 2014.
- BANSAL, Y. et al. *Fusarium sacchari*, a cause of mycotic keratitis among sugarcane farmers-a series of four cases from North India. **Mycoses**, v. 59, n. 11, p. 705-709, 2016.
- AQUINO, I. S. et al. Evaluation of disinfectants for elimination of fungal contamination of patient beds in a reference hospital in Piauí, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.188, n. 11, p. e644, 2016.
- BRASIL, Resolução - RDC nº 12 de 2 de Janeiro de 2001. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos. In: Diário Oficial da União. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA: Brasília (DF); 2001. Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm
- CASTRO, R. D. et al. Use of alcohol vinegar in the inhibition of *Candida* spp. and its effect on the physical properties of acrylic resins. **BMC Oral Health**. v. 15, n. 52, p. 1-7. 2015.
- DE CARVALHO, L. R.; DE MAGALHÃES, J.T. Avaliação da qualidade microbiológica do caldo de cana comercializado no centro de Itabuna-BA e práticas de produção e higiene de seus manipuladores. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 240-245, 2007.
- DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2ª ed. Washington (DC): ASM Press; 2000, 1126p.
- DE SOUZA, D. R. et al. Efeitos tóxicos de fungos nos alimentos. **Revinter**, v. 10, n. 2, p. 73-84, 2017.
- MARIA, G. L. Diversity of *Candida* spp. isolated from soils of cultivated area in the presence of pesticides and adjacent native forest: planktonic sensitivity and biofilms. 61f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.
- MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective role of yeasts. **Microorganisms**. v.3, n.4, p. 588-611, 2015.
- NONGA, H. E. et al. Survey of physicochemical characteristics and microbial contamination in selected food locally vended in Morogoro Municipality, Tanzania. **BMC Research Notes**. v.8, n. 1, p. 1-10, 2015.
- NUNES, E. E. et al. Evaluation of different sanitizers on the microbiological quality of fresh-cut peruvian carrot. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 34, n. 4, p. 990-994, 2010.
- OKOJIE, P. W.; ISAH, E. C. Sanitary conditions of food vending sites and food handling practices of street food vendors in Benin City, Nigeria: implication for food hygiene and safety. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2014, p. 1-6. 2014.
- RENUKA, S.; RAMANUJAM, B.; POORNESHA, B. Endophytic ability of different isolates of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in stem and leaf tissues of maize (*Zea mays* L.). **Indian Journal of Microbiology**. v. 56, n. 2, p. 126-133, 2016.
- SOUZA, A. M. et al. Most consumed foods in Brazil: National Dietary Survey 2008-2009. **Revista de Saúde Pública**. v.47, p. 190s- 199s, 2013.
- XU, S. X. et al. An acidic pectin lyase from *Aspergillus niger* with favourable efficiency in fruit juice clarification. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 2, p.181-187, 2015.
- VYLKOVA, S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. **PLOS Pathogens**. v.13, n. 2, p. e1006149, 2017.
- ZAITS C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010, 456p.

Submissão: 01/04/2020

Aprovação: 06/11/2020