

Investigação de Parasitas e Coliformes em Hortaliças Folhosas Provenientes de Restaurantes Self-Service em Shopping Centers

Investigation of Parasites and Coliforms in Leafy Vegetables from Self-Service Restaurants in Shopping Centers

Rafael Alves Santomauro^{*a}; Leonardo Teixeira da Silva^a; Mariana Ribeiro Sato^a; Beatriz Abrahão Bueno de Morais^a; Leticia da Silva Bueno Souza^a; Julia Ferreira Dias^a; Mariana da Silva Marques^a; Nathália Miasato Pimont^a; Fernanda Pinto-Ferreira^a; Letícia Santos Balbino^b

^aUniversidade Estadual de Londrina, curso de Medicina Veterinária. PR, Brasil.

^bUniversidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência Animal. PR, Brasil.

*E-mail: rafaelsantomauro@gmail.com

Resumo

A contaminação de hortaliças, nas diferentes etapas da cadeia produtiva, oferece riscos à saúde humana, pois, quando ingeridas cruas, podem ser veículos de parasitos e microrganismos causadores de doenças veiculadas por alimentos (DVA), sendo um importante problema de saúde pública. Os shopping centers são locais muito visitados para alimentação, contudo, poucos são os estudos referentes às condições higiênico-sanitárias dos seus restaurantes. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de contaminações, parasitária e microbiológica, em hortaliças folhosas comercializadas em restaurantes self-service localizados em shopping centers, do município de Londrina, Paraná. Foram visitados 12 restaurantes oriundos de sete shoppings, nos quais coletaram-se ao todo 23 amostras, submetidas a pesquisas parasitária (centrífugo-flutuação em solução de sacarose e sedimentação espontânea) e microbiológica. Todas elas (23/23) continham coliformes totais (> 2419,6 NMP/100mL) e 78,26% (18/23), *Escherichia coli*. Todos os restaurantes apresentaram contaminação por *E. coli* em ao menos um dos dias de coleta, sendo 26,08% (6/23) com grau de contaminação acima da permitida na legislação brasileira. Não houve relação entre os níveis de contaminação e a região geográfica onde os restaurantes estão inseridos. Nenhuma amostra foi positiva nos testes parasitológicos. Devido à elevada contaminação microbiológica das amostras de salada, medidas sanitárias devem ser realizadas nos referidos estabelecimentos. Sugere-se, ainda, que os isolados sejam submetidos à PCR, teste mais sensível, para identificação do sorotipo bacteriano, para determinar o risco de doenças, bem como de eventuais parasitos de importância para a saúde pública.

Palavras-chave: Contaminação. *Escherichia coli*. Parasitos. Saúde Pública. Vegetais.

Abstract

*Vegetables contamination, in the different stages of production chain, offers health risks, because, when ingested raw, it can be vehicles of parasites and microorganisms that cause foodborne diseases (FBD), an important public health problem. Shopping malls are highly visited places for food, however, there are few studies regarding the hygienic-sanitary conditions of their restaurants. Thus, the objective of this study was to investigate the occurrence of parasitic and microbiological contamination in leafy vegetables sold in self-service restaurants located in shopping centers in the city of Londrina, Paraná. Twelve restaurants from seven malls were visited, in which a total of 23 samples were collected, submitted to parasitic (centrifugal-flotation in sucrose solution and spontaneous sedimentation) and microbiological research. All of them (23/23) contained total coliforms (> 2419.6 MPN/100mL) and 78.26% (18/23) *Escherichia coli*. All restaurants showed microbiological contamination by *E. coli* on at least one of the collection days. There was no relationship between contamination levels and the geographic region where the restaurants are located. In the analyses, 26.08% (6/23) showed a degree of contamination above that permitted by Brazilian legislation for *E. coli*. No sample was positive in the parasitological tests. Due to the high microbiological contamination of the salad samples, preventive measures must be carried out in these establishments, aiming to reduce the occurrence of foodborne diseases. It is also suggested that the samples be submitted to molecular analysis to identify the bacterial serotype, as well as any parasites of importance to public health.*

Keywords: Contamination. *Escherichia coli*. Parasites. Public Health. Vegetable.

1 Introdução

Hortaliças são indispensáveis à alimentação saudável, pois são abundantes em compostos funcionais, como fibras, vitaminas, minerais e substâncias relacionadas à inibição do surgimento de cânceres, obesidade, diabetes e doenças circulatórias, enquanto são pobres em carboidratos e lipídeos (CARVALHO et al., 2006; FAVELL, 1998; WYNN et al., 2010).

Embora o consumo de vegetais seja de extrema importância, sabe-se que a ingestão destes, sobretudo quando crus, representa riscos à saúde humana, porque são importantes vias

de transmissão de patógenos (PINTO-FERREIRA et al., 2019; VOLLKOPF; LOPES; NAVARRO, 2006). A contaminação desses vegetais, na maioria das vezes, está associada à higiene deficiente nas diferentes etapas produtivas das hortaliças, bem como durante seu armazenamento e preparo para consumo (AL NAHHAS; ABOUALCHAMAT, 2020; FERREIRA et al., 2018a; PINTO FERREIRA et al., 2019).

As parasitoses intestinais, amplamente prevalentes em países em desenvolvimento, apresentam manifestações clínicas variadas, como desnutrição, má absorção intestinal, diarreia e dores abdominais. Enquadram-se entre as mais

de 250 doenças veiculadas por alimentos (DVAs), sendo importante problema de saúde pública (MARZAGÃO et al., 2010; SARAIVA et al., 2005).

Toxinfecções alimentares também têm grande importância à saúde humana. São DVAs causadas a partir de microrganismos patogênicos que se multiplicam em alimentos conservados sob condições inadequadas. Dentre essas bactérias, destaca-se *Escherichia coli*, cujas cepas enterotoxigênicas são responsáveis por quadros de diarreia, febre, dores abdominais e náuseas (FRANCO, 2003).

As condições higiênicas e sanitárias de restaurantes localizados em shopping centers são pouco estudadas (CASTRO et al., 2006). Desse modo, devido à importância das hortaliças na veiculação de patógenos importantes à saúde humana, o presente estudo buscou detectar contaminações parasitária e microbiológica em vegetais folhosos oriundos de restaurantes self-service situados em shopping centers do município de Londrina, Paraná.

2 Material e Métodos

2.1 Local de estudo

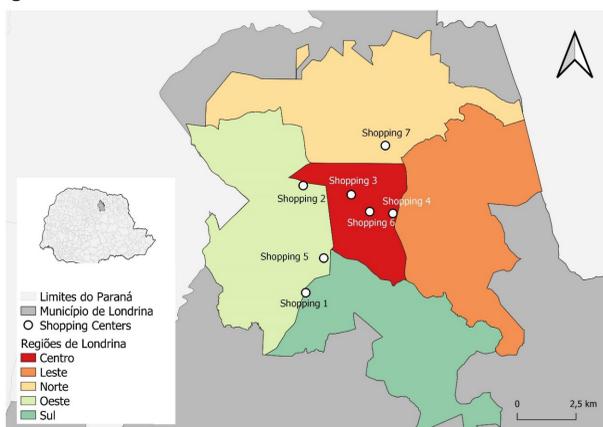
Londrina (23°18'37" S e 51°09'46" W) é a segunda maior cidade do Estado do Paraná, sul do Brasil, sendo considerada a mais importante de uma região metropolitana (PINTO-FERREIRA et al., 2020). É um município de IDHM elevado, 0,778 e a população estimada é 580.870 habitantes (IBGE, 2021). Durante os meses de agosto a setembro de 2022, foram visitados um total de 12 restaurantes self-service por quilo, nomeados de A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L (Quadro 1), localizados em sete shopping centers, numerados de 1 a 7 (Figura 1). Em cada shopping, foram escolhidos, aleatoriamente, dois estabelecimentos, dos quais foram adquiridos, aproximadamente, 100 gramas de hortaliças herbáceas, identificadas e armazenadas em recipiente de isopor, sob refrigeração, até processamento no laboratório. Para avaliar a possível recorrência das contaminações, os vegetais, em cada restaurante, foram coletados em dois momentos distintos, com intervalo aproximado de 30 dias entre eles.

Quadro 1 - Hortaliças coletadas em restaurantes self-service de shopping centers, no município de Londrina, Paraná, agosto a setembro de 2022

Shopping Center	Região do Município	Restaurante	Preço/Kg (R\$)	Amostras dia 01	Amostras dia 02
1	Sul	A	73,90	Alface crespa	Alface crespa e rúcula
1	Sul	B	79,90	Alface crespa e rúcula	Alface crespa, alface americana e alface roxa
2	Oeste	C	89,90	Alface crespa	Alface crespa
2	Oeste	D	42,90	Alface crespa	Alface crespa
3	Oeste	E	42,90	Alface crespa	Alface crespa
3	Oeste	F	39,90	Alface crespa	Alface crespa
4	Central	G	79,90	Alface crespa e alface roxa	Alface roxa e rúcula
4	Central	H	64,90	Alface crespa	Alface crespa
5	Oeste	I	73,90	Alface crespa e rúcula	Alface crespa e alface americana
5	Oeste	J	79,90	Alface americana	Alface crespa e rúcula
6*	Central	K	60,60	Alface roxa e agrião	Alface crespa
7*	Norte	L	79,90	Rúcula	**

*Shopping centers que apresentavam apenas um restaurante self-service por quilo ou apenas um restaurante self-service por quilo com salada à disposição; ** Restaurante encerrou suas atividades antes que a amostra do dia dois pudesse ser adquirida.

Figura 1 - Mapa do Paraná, com ênfase no município de Londrina, e distribuição dos shopping centers e seus respectivos restaurantes self-service, pontos de coleta das hortaliças folhosas, agosto a setembro de 2022



Fonte: os autores.

2.2 Análise das amostras

Para a detecção das formas parasitárias, foi utilizado o protocolo adaptado de (FERREIRA et al., 2018b), no qual 50 gramas de cada amostra foram lavadas em 200 mL solução de glicina 1M, sob agitação em saco plástico de primeiro uso estéril, por cinco minutos. Em seguida, 100 mL dessa solução utilizada na lavagem foi colocada em copo de sedimentação para a realização do teste de Hoffman, Pons & Janer (1934), a solução remanescente foi distribuída em dois tubos de fundo cônico de 50 mL cada e centrifugados a 2100 x g por 10 minutos, duas vezes.

O sedimento obtido dos tubos foi testado para a técnica de centrifugo-flutuação em solução de sacarose (SHEATHER, 1923). Após a confecção das lâminas para o teste de sedimentação, o líquido foi centrifugado em dois tubos de fundo cônico de 50 mL cada e centrifugados a 2100 x g

por 10 minutos, duas vezes, o sobrenadante descartado e os sedimentos obtidos foram aliquotados em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20°C para posterior extração de DNA. As lâminas confeccionadas foram visualizadas no microscópio óptico Olympus BX43 (Shinjuku, Tóquio, Japão), aumentos de 20X e 40X.

Para a análise microbiológica, aproximadamente 50 gramas de cada amostra foram lavadas em saco plástico estéril de primeiro uso com 100mL de água destilada estéril, sob agitação vigorosa por cinco minutos. A solução resultante da lavagem foi submetida à técnica do substrato cromogênico, conforme as orientações do fabricante (Colilert, Idexx, Westbrook, Maine, EUA). Os resultados foram expressos em NMP/100mL, número mais provável de coliformes totais ou *Escherichia coli* por 100 mL de água.

Para a tabulação dos parasitos e resultados das análises moleculares (PCR), bem como para as análises estatísticas, foi utilizado o software de planilhas Excel (Microsoft, Redmond, Washington, EUA).

3 Resultados e Discussão

Ao todo, 12 restaurantes foram visitados em sete shopping centers, totalizando 23 amostras (Quadro 1). Todas as amostras (23/23) foram negativas nos testes de sedimentação espontânea e centrífugo-flutuação em solução de sacarose. Na análise microbiológica, 100% (23/23) das amostras apresentaram > 2419,6 NMP/100 mL de coliformes totais, 78,26% (18/23), *E. coli* (Quadro 2). Todos os restaurantes avaliados (12/12) vendiam hortaliças contaminadas por *E. coli* em ao menos um dos dias de coleta, variando entre < 1 e > 2419,6 NMP/100mL (Quadro 2). Variedades de alface foram as mais presentes nas amostras dos restaurantes avaliados, 95,65% (22/23) e, dessas, 77,27% (17/22) estavam contaminadas por *E. coli*, variando de zero a > 2419,6 NMP/100mL (Quadro 1). Rúcula ocorreu em 30,43% (7/23) das amostras, sendo 100% (7/7) contaminadas por *E. coli*, variando de zero a > 2419,6 NMP/100mL. Agrião estava em apenas uma das amostras de salada, 4,35% (1/23) e não apresentou contaminação por *E. coli*.

Quadro 2 - Análise da presença de *Escherichia coli* em amostras de hortaliças oriundas de restaurantes self-service de shopping centers, em Londrina, Paraná, identificadas pelo teste Colilert, agosto a setembro de 2022

Shopping center/ restaurante	<i>E. coli</i> (NMP/100mL), Dia 01	<i>E. coli</i> (NMP/100mL), Dia 02
1/A	> 2419,6	25,3
1/B	ausente	56,3
2/C	8,5	82,0
2/D	3,0	> 2419,6
3/E	ausente	201,2
3/F	ausente	39,3
4/G	ausente	3,0
4/H	7,5	8,6
5/I	4,1	111,9
5/J	2,0	350,0

Shopping center/ restaurante	<i>E. coli</i> (NMP/100mL), Dia 01	<i>E. coli</i> (NMP/100mL), Dia 02
6*/K	ausente	30,4
7*/L	117,8	**

*Shopping centers que apresentavam apenas um restaurante self-service por quilo ou apenas um restaurante self-service por quilo com salada à disposição; ** Restaurante encerrou suas atividades antes que a amostra do dia dois pudesse ser adquirida.

Fonte: dados da pesquisa.

O restaurante G (shopping número 4, região Central) foi o que apresentou menor contaminação microbiológica por *E. coli*, 3,0 NMP/100mL, apenas no segundo dia de coleta, enquanto A (shopping número 1, região Sul) e D (shopping número 2, região Oeste) demonstraram os maiores valores, > 2419,6 NMP/100 mL.

Os métodos de sedimentação espontânea (HOFFMAN, PONS; JANER, 1934) e centrífugo-flutuação em solução de sacarose (SHEATHER, 1923) são técnicas de elevada sensibilidade no diagnóstico de estruturas parasitárias em testes coproparasitológicos (ARAÚJO et al., 2021; CUNHA; RODRIGUES JUNIOR, 2021), contudo, apresentam limitações quando utilizados em amostras ambientais. Mesmo havendo elevada contaminação por coliformes fecais nas amostras desse estudo, nenhuma foi positiva parasitos nas técnicas empregadas. Uma possibilidade para esse resultado, seria o número reduzido de parasitos que, mesmo presentes, poderiam não ser detectados nos testes, como ocorreu com (PINTO-FERREIRA et al., 2020), que pesquisaram por parasitos em amostras de alfaces oriundas de supermercados a partir de técnicas de flutuação, sedimentação e molecular e identificaram *T. gondii* em uma das 30 amostras (3,33%) apenas na reação em cadeia da polimerase (PCR).

A Instrução Normativa nº 60/2019 da Anvisa (BRASIL, 2019) estabelece limites máximos e aceitáveis para a presença de contaminação microbiológica em alimentos: para hortaliças cruas, higienizadas e disponíveis para o consumo, permite-se até 100 NMP de *E. coli* por grama de alimento (BRASIL, 2019). O grau de contaminação por coliformes totais, contudo, não é mencionado. Nesta pesquisa, 26,08% (6/23) das amostras apresentaram níveis acima dos permitidos na legislação, número elevado, visto que as verduras devem ser submetidas à higienização adequada antes de serem disponibilizadas aos consumidores, e que as bactérias são sensíveis aos sanitizantes comerciais.

Alface foi o vegetal folhoso mais frequentemente encontrado nos restaurantes visitados, 95,25% (22/23), provavelmente por ser um dos vegetais mais populares e consumidos no país, pois é de fácil cultivo e acesso da população. Essa verdura apresenta caule curto e folhas abundantes, com grande superfície de contato com o substrato onde é cultivado, favorecendo contaminações, um risco àqueles que o ingerem (DARYANI et al., 2008; MONTANHER; CORADIN; FONTOURA-DA-SILVA, 2007). Rúcula, por sua vez, é uma hortaliça de folhas pequenas e múltiplas, o

que dificulta a higienização, fato que pode ter colaborado para a contaminação microbiológica desses alimentos nos estabelecimentos avaliados (PENA et al., 2015).

A região Sul de Londrina é considerada socioeconomicamente privilegiada, localiza-se próxima ao centro comercial do município e é abundante em diferentes empreendimentos de elevado padrão, como restaurantes, hospitais, escolas e universidades. O restaurante A, situado num dos shopping centers mais conceituados do município, na região Sul, foi um dos que mais apresentou contaminação por *E. coli* nas amostras de hortaliças. Outro estabelecimento com elevados índices de contaminação foi D, localizado na região Oeste da cidade, que abriga amplo número de comércios, porém afastada do centro comercial principal, sendo considerada menos privilegiada socioeconomicamente que a anteriormente citada. A região Central abriga ampla variedade comercial e elevado fluxo de pessoas. O restaurante G, nessa área, está presente num dos maiores e mais frequentados shoppings da cidade e foi que menos apresentou contaminação microbiológica (3,0 NMP *E. coli*/100mL). A partir dessas informações, percebe-se que não há distinção entre os padrões de vida e o nível de contaminação microbiológica, visto que restaurantes de regiões de elevado e baixo padrões apresentaram elevada positividade, sendo essa associada, possivelmente, às más práticas de higiene durante o preparo dos alimentos. Resultados semelhantes foram observados por (BEZERRA et al., 2020) que, ao analisarem dez amostras de alfaces utilizadas em saladas de cinco restaurantes self-service, verificaram que os níveis de contaminação por *E. coli* em restaurantes das classes “A” e “C” são semelhantes, não diferindo estatisticamente.

4 Conclusão

Em virtude da elevada contaminação por *E. coli*, este estudo demonstrou que o consumo de saladas cruas em restaurantes self-service localizados nos shopping centers de Londrina, Paraná, independente do padrão socioeconômico em que se localizam os estabelecimentos, podem representar riscos à saúde do consumidor. Medidas preventivas, visando reduzir a transmissão de doenças por alimentos, são necessárias em todos os estabelecimentos. Recomenda-se que as amostras sejam submetidas a análises moleculares, para identificação dos sorotipos bacterianos, bem como de eventuais parasitos não identificados nos testes parasitológicos.

Referências

- AL NAHHAS, S.; ABOUALCHAMAT, G. Investigation of parasitic contamination of salad vegetables sold by street vendors in city markets in Damascus, Syria. *Food Waterb. Parasitol.*, v. 21, dez. 2020.
- ARAÚJO, M. DOS S. M. DE et al. Comparação de técnicas no diagnóstico enteroparasitário em pacientes HIV positivo no alto pantanal. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 8, p. e30510817262, 2021.
- BEZERRA, A.A. et al. Análise microbiológica de alfaces em

saladas cruas comercializadas em restaurantes comerciais da cidade de Petrolina, Pernambuco, Brasil. *Braz. J. Develop.*, v.6, n.12, p.100252-100625, 2020.

- BRASIL. Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 dez. 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 4 jun. 2023.
- CARVALHO, P.G.B. et al. Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticult. Bras.*, v.24, n.4, p.397-404, 2006.
- CASTRO, R. D.; DAIUTO, É. R.; VIEITES, R. L. Análise Microbiológica e de Pesticidas em Tomates Consumidos em Restaurantes em Botucatu-SP. *Nativa*, v.4, n.6, p.398-402, 2016.
- FAVELL, D.J. A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chem.*, v. 62, n.1, p.59-64, 1998.
- CUNHA, I.P.; RODRIGUES JUNIOR, O.M. Avaliação da sensibilidade dos métodos direto à fresco e Hoffman para *Ascaris Lumbricoides*. *Res. Soc. Develop.*, v.10, n.15, p.e496101523460, 2021.
- DARYANI, A. et al. Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. *Food Control*, v.19, n.8, p.790-794, 2008.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2003.
- FERREIRA, F.P. et al. The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.27, n.3, p.327-337, 2018a.
- FERREIRA, F. P. et al. The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.27, n.3, p.327-337, 2018b.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J.A.; JA NER, J. L. Sedimentation method in Schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med.*, v.9, p.283-298, 1934.
- MARZAGÃO, M. et al. Ocorrência de parasitoses intestinais em habitantes do município de Pará de Minas, MG – Brasil Occurrence of intestinal parasitosis among inhabitants of Pará de Minas, MG – Brazil. *Rev. Bras. Farm.*, v.91, n.4, p.183-188, 2010.
- MONTANHER, C.C.; CORADIN, D.C.; FONTOURA-DASILVA, S.E. Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca Sativa*) comercializadas em restaurantes self-service por quilo, da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. *Est. Biol.*, v.29, n.66, p.63-71, 2007.
- PENA, F. DE L. et al. Avaliação microbiológica de hortaliças minimamente processadas disponíveis no mercado e servidas em redes de fast-food e em unidades de alimentação e nutrição nas cidades de Limeira e Campinas, São Paulo, Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 22, n. 1, p. 633, 2015.
- PINTO-FERREIRA, F. et al. Patterns of transmission and sources of infection in outbreaks of human toxoplasmosis. *Emerg. Infect. Dis.*, v.25, n.12, p.2177-2182, 2019.
- PINTO-FERREIRA, F. et al. Molecular diagnosis of the curly lettuce parasitic contamination from hydroponic cultivation from supermarkets. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.29, n.4, 2020.
- SARAIVA, N. et al. Incidência da Contaminação Parasitária em Alfaces nos Municípios de Araraquara (SP) e São Carlos (SP). *Rev. Bras. Multidisc.*, v.9, n.1, p.213, 2005.
- SHEATHER, A.L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. *J. Comp. Pathol. Therap.*, v.36, p.266-275, 1923.

VOLLKOPF, P.C.P.; LOPES, F.M.R.; NAVARRO, I. Ocorrência de enteroparasitos em amostras de alface (*lactuca sativa*) comercializadas em porto Murquinho - MS. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, p.37-40, 2006.

WYNN, E. et al. Postgraduate symposium: positive influence of nutritional alkalinity on bone health. Proc. Nutr. Soc.y, v.69, n.1, p.166-173, 2010.