

Editora Fucamp

# Inspeção de Produtos de Origem Animal



Laryssa Freitas Ribeiro

**Laryssa Freitas Ribeiro**

# **Inspeção de Produtos de Origem Animal**

**1ª edição**

**Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil UniFucamp**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Lumos Assessoria Editorial  
Bibliotecária: Priscila Pena Machado CRB-7/6971

R484 Ribeiro, Laryssa Freitas.

Inspeção de produtos de origem animal [recurso eletrônico] / Laryssa Freitas Ribeiro. — 1. ed. — Monte Carmelo : Unifucamp, 2023.  
Dados eletrônicos (pdf).

Inclui bibliografia.  
ISBN 978-65-5854-960-4

1. Produtos animais - Inspeção. 2. Alimentos de origem animal - Adulteração e inspeção. 3. Engenharia de alimentos. 4. Tecnologia de alimentos. I. Título.

CDD23: 664.907

ISBN 978-65-5854-960-4



9 786558 549604

Dedico este livro ao meu pequeno príncipe,  
o menino sorriso e meu grande amor,  
meu filho Antônio.

© 2023, Laryssa Freitas Ribeiro

Todos os direitos reservados à autora. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

**Elaboração, distribuição e informações:**

**EDITORA FUCAMP**

Av. Brasil Oeste, s/n – Jardim Zenith 38500-000 – Monte Carmelo – MG Tel.:  
(34) 3842-5272 fucamp@fucamp.edu.br <https://www.unifucamp.edu.br/editora-fucamp/>

**Reitor do UNIFUCAMP:** Mestre Guilherme Marcos Ghelli

**Coordenadora da Editora:** Doutora Cristina Soares de Sousa

**Comissão Editorial**

Dr. Guilherme Saramago de Oliveira (Universidade Federal de Uberlândia)

Dr. Gustavo Araújo Batista (UNIUBE)

Dr. José Alberto Coraiola (Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Faculdade Integradas Camões)

Dra. Kelma Gomes Mendonça Ghelli (Centro Universitário Mário Palmério)

Dr. Leandro de Souza Leão (Universidade Federal de São João del-Rei)

Dr. Luiz Carlos Figueira de Melo (Universidade Federal de Uberlândia)

Dra. Núbia dos Santos Saad (Universidade Federal de Uberlândia)

Dra. Raquel Rosan Christino Gitahy (Universidade do Oeste Paulista – Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul)

Dra. Roselaine das Chagas Fonseca (Centro Universitário Mário Palmério)

Dra. Tânia Nunes Davi (Centro Universitário Mário Palmério)

**Representante do Setor da Biblioteca:** Glivânia Balbino da Silva

**Representante do técnico administrativo:** Liamar Nunes Silveira Monteiro

## **Apresentação**

Este livro nasceu do anseio de organizar alguns pontos importantes sobre a inspeção de produtos de origem animal. Para isso, será discutido temas como a segurança de alimentos na perspectiva da Saúde Única; Fatores, intrínsecos e extrínsecos, que influenciam a sobrevivência e o desenvolvimento de microrganismos em alimentos; Principais alterações dos alimentos de origem animal; Colheita, transporte e preparo de amostras de alimentos destinadas a exames microbiológicos e físico-químicos; Microrganismos indicadores e patogênicos em alimentos: conceitos, usos e interpretações; Métodos convencionais de análises microbiológicas de alimentos; Métodos moleculares de análises de alimentos; Principais análises e medidas de controle recomendadas para a avaliação da qualidade de alimentos; Principais doenças veiculadas por alimentos e respectivos grupos de microrganismos envolvidos; Segurança de alimentos e Vigilância em Saúde - notificação, investigação de surtos e atuação multiprofissional. Assim, este e-book poderá ajudar os estudantes interessados nos temas e os diferentes profissionais que trabalham com inspeção de produtos de origem animal, buscando um alimento seguro e de qualidade!

## **A autora – Laryssa Freitas Ribeiro**



Médica veterinária, formada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal. Realizou estágio na mesma universidade, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, no Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal e Água, sob a supervisão do professor Dr. Luiz Augusto do Amaral, teve duas iniciações científicas com bolsa da Fundação de Amparo de e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Durante seu estágio curricular foi para o Laboratório de Escherichia coli (EcL) da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá, sob a supervisão do prof. Dr. John Morris Fairbrother, no qual acompanhou e executou atividades, melhorando seu conhecimento teórico e prático. Em agosto de 2011 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da UNESP, campus Jaboticabal, também sob a supervisão do prof Dr. Luiz Augusto do Amaral, e também com bolsa FAPESP, estagiando mais uma vez no Laboratório de Escherichia coli (EcL) da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá para um mestrado sanduíche. Voltou ao Brasil, e terminou o mestrado em 18 meses. Em março de 2013 ingressou no curso de Doutorado em Medicina Veterinária da UNESP, campus Jaboticabal, também sob a supervisão do prof Dr. Luiz Augusto do Amaral, com bolsa Capes e auxílio Fapesp. Fez doutorado sanduíche, mais uma vez no Canadá, a convite do prof. Dr. John Morris Fairbrother, a qual permaneceu por 10 meses. Retornou ao Brasil em setembro de 2015, terminando o doutorado em 06 de dezembro de 2016. Em 2017 foi professora temporária da Universidade de São Paulo, na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, campus USP Fernando Costa, ministrando aulas para os cursos de Medicina Veterinária e Zootecnia. Atualmente é professora e coordenadora do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Mário Palmério (UNIFUCAMP), em Monte Carmelo, Minas Gerais e também, coordenadora do Programa de Serviço de Inspeção Municipal – SIM do Consórcio Intermunicipal de Região Integrada de Desenvolvimento Sustentável (RIDES).

## **Agradecimentos**

Quero começar a agradecer a Jesus porque tudo que tenho e sou, devo à Ele. Obrigada Senhor por todas suas bênçãos em minha vida!

Aos meus pais, João Ulisses Ribeiro e Elza Aparecida de Freitas, meus eternos agradecimentos por tudo! Vocês abraçaram todos meus sonhos, sempre me apoiando com muito amor e carinho, fazendo muitos sacrifícios, por isso serei eternamente grata!

À Vânia Célia Ferreira, minha segunda mãe, que nos adotou e tem muito amor e carinho pela nossa família.

Ao meu irmão Ulisses Ribeiro, minha cunhada Tati Melo, minha afilhada Maria Eduarda, que sempre me apoiam nos diferentes momentos...

À família que eu formei: meu marido Henrique Suriani, obrigada pela parceria, lealdade e amor e ao meu pequeno grande amor, meu filho, Antônio Suriani Ribeiro, razão do meu viver!

Aos meus sogros, Narciza e Zaqueu e minha mãe Elza, que enquanto eu produzia o e-book, ajudaram a cuidar do nosso bebê com muito amor e zelo!

À professora Ana Maria Centola Vidal, a qual tenho muita admiração e aceitou o convite para escrever o prefácio deste e-book.

Quero agradecer à equipe do Consórcio Intermunicipal de Região Integrada de Desenvolvimento Sustentável (RIDES), em nome do secretário executivo Diego Cavalcante Mota e dos colegas Higor Oliveira Silva, Jéssica Mundim Nascimento Mota, Kássio Henrique Gama Souza, Rosemeire Batista Miranda, Thays Soares e a estagiária Yasmin Teixeira de Resende Souza, porque trabalhar com inspeção de produtos de origem animal e com essa equipe é leve e isso faz com que os dias sejam sempre bons! Obrigada pelo dia a dia e pelo carinho, mas principalmente pelo apoio profissional.

Também quero registrar meus agradecimentos ao Centro Universitário Mário Palmério (UNIFUCAMP), nas pessoas do professor Ms. Guilherme Marcos Ghelli, reitor, da professora doutora Kelma Gomes Mendonça Ghelli, diretora de ensino e da Dra. Cristina Soares de Sousa, coordenadora da editora, pelo incentivo e disposição para a concretização da publicação desse e-book!



## **Prefácio**

Não poderia iniciar este prefácio sem destacar o quanto me honra e me satisfaz escrevê-lo, pois, trata-se de uma obra voltada a área de Inspeção de Produtos de Origem Animal e fruto da dedicação de uma médica veterinária, Laryssa Freitas Ribeiro, da qual tenho profunda admiração. Admiração esta, que extrapola a esfera profissional, pois esta obra foi escrita não só pela docente e coordenadora de um curso de medicina veterinária extremamente competente, mas também pela “recém mãe”, que preocupada com o ensino, abdicou de momentos com o próprio filho para escrevê-la.

Esta obra descreve de uma maneira objetiva e clara, sobre ferramentas que sustentam a Inspeção de Produtos de Origem Animal, como a Segurança de alimentos na perspectiva da Saúde Única; Fatores intrínsecos e extrínsecos, que influenciam a sobrevivência e o desenvolvimento de microrganismos em alimentos; Principais alterações dos alimentos de origem animal; Colheita, transporte e preparo de amostras de alimentos destinadas a exames microbiológicos e físico-químicos; Microrganismos indicadores em alimentos; Métodos convencionais de análises microbiológicas de alimentos; Métodos moleculares de análises de alimentos; Principais análises e medidas de controle recomendadas para a avaliação da qualidade de alimentos; Principais doenças veiculadas por alimentos e respectivos grupos de microrganismos envolvidos; Segurança de alimentos e Vigilância em Saúde - notificação, investigação de surtos e atuação multiprofissional.

Vale ainda ressaltar que a mesma vem a preencher uma lacuna na forma de e-book para literatura Nacional, principalmente voltada para fundamentar o ensino da inspeção para estudantes de graduação e profissionais que atuam na área, sendo que em seu preparo a autora teve o cuidado para utilizar bibliografias atualizadas e descritas de forma muito coerente.

Por fim, o (a) leitor (a) tem aqui um e-book importante para sua formação, preparação e também para consulta e que certamente traz fundamental contribuição para que os profissionais da área.

Professora Ana Maria Centola Vidal

Professora da Universidade de São Paulo, na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, campus USP Fernando Costa.

## Sumário

<b>Introdução .....</b>	<b>11</b>
<b>Capítulo 1 - Segurança de alimentos na perspectiva da Saúde Única.....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 2 - Fatores intrínsecos e extrínsecos, que influenciam a sobrevivência e o desenvolvimento de microrganismos em alimentos ....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo 3 - Principais alterações dos alimentos de origem animal.....</b>	<b>28</b>
<b>Capítulo 4 - Colheita, transporte e preparo de amostras de alimentos destinadas a exames microbiológicos e físico-químicos.....</b>	<b>35</b>
<b>Capítulo 5 - Microrganismos indicadores em alimentos .....</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 6 - Métodos convencionais de análises microbiológicas de alimentos.....</b>	<b>52</b>
<b>Capítulo 7 - Métodos moleculares de análises de alimentos.....</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo 8 - Principais análises e medidas de controle recomendadas para a avaliação da qualidade de alimentos.....</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo 9 - Principais doenças veiculadas por alimentos e respectivos grupos de microrganismos envolvidos.....</b>	<b>82</b>
<b>Capítulo 10 - Segurança de alimentos e Vigilância em Saúde - notificação, investigação de surtos e atuação multiprofissional.....</b>	<b>97</b>
<b>Referências.....</b>	<b>105</b>

## Introdução

É de suma importância a presença de um médico veterinário na inspeção de produtos de origem animal, pois é o profissional que domina toda cadeia produtiva. Isso porque, na maior parte das vezes os produtos impróprios apresentam alterações na cor, textura, cheiro e sabor, mas isso não é uma regra, podendo estar impróprio mesmo com boa aparência, no caso daqueles que possuem microrganismos patogênicos. Por conta disso, o profissional que conhece as particularidades do processo produtivo pode impedir que este alimento impróprio chegue à sua mesa.

Assim, a inspeção é realizada previamente na obtenção, manipulação e beneficiamento dos produtos de origem animal evitando riscos aos consumidores, praticando, portanto, uma forma de medicina preventiva através da inocuidade dos alimentos derivados dos animais.

Alimentos obtidos sem controle algum são passíveis de contaminações físicas, químicas, microbiológicas e fraudes. Podem causar doenças como intoxicações alimentares, parasitoses e doenças conhecidas por zoonoses, como tuberculose, brucelose, entre outras. Por este motivo, a inspeção de produtos de origem animal é obrigatória em todo território nacional.

Os sistemas brasileiros de inspeção sanitária de produtos de origem animal são regulamentados por um conjunto de leis, decretos, resoluções, portarias e outros instrumentos legais. Essa legislação trata do funcionamento dos serviços de inspeção e fiscalização sanitária dos estabelecimentos produtores de alimentos.

E, para os produtos de origem animal (POA), existem quatro tipos inspeção que garantem a qualidade do alimento, para que este chegue com maior segurança à mesa do consumidor. A inspeção de POA municipal é realizada pelo médico veterinário do município e a comercialização ocorre somente dentro do município, sendo que o selo, presente nos alimentos, deve ter a sigla S.I.M.. Porém, quando realizado via consórcio, poderá ser comercializado entre os municípios do mesmo.

Já a inspeção estadual é realizada pelo órgão do estado (por exemplo, no caso de Minas Gerais é o IMA) com o selo contendo a sigla S.I.E., sendo que a comercialização pode ser feita em todo o estado. Já a inspeção federal é feita

pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a comercialização pode ser feita em todo território nacional e, além disso, exportada, tendo, assim, no selo, a sigla S.I.F.. Além destes três, hoje o Brasil possui o Sistema Unificado De Atenção à Sanidade Agropecuária (SISBI), a qual a inspeção pode ser feita via município (ou consórcio) ou via estado e o comércio poderá ser realizado a nível nacional, desde que aprovado pelo MAPA.

Sabendo da importância da inspeção de produtos de origem animal e de como é realizada, nos quatro âmbitos que existem, neste e-book será discutido temas como a segurança de alimentos na perspectiva da Saúde Única; Fatores, intrínsecos e extrínsecos, que influenciam a sobrevivência e o desenvolvimento de microrganismos em alimentos; Principais alterações dos alimentos de origem animal; Colheita, transporte e preparo de amostras de alimentos destinadas a exames microbiológicos e físico-químicos; Microrganismos indicadores e patogênicos em alimentos: conceitos, usos e interpretações; Métodos convencionais de análises microbiológicas de alimentos; Métodos moleculares de análises de alimentos; Principais análises e medidas de controle recomendadas para a avaliação da qualidade de alimentos; Principais doenças veiculadas por alimentos e respectivos grupos de microrganismos envolvidos; Segurança de alimentos e Vigilância em Saúde - notificação, investigação de surtos e atuação multiprofissional.

## Capítulo 1 - Segurança de alimentos na perspectiva da Saúde Única

Nos últimos 30 anos, o mundo sofreu grandes acontecimentos, os quais impactaram a segurança dos alimentos e as zoonoses. Em 1989, por exemplo, houve a queda do muro de Berlim, estabelecendo o fim da “guerra fria” e do mundo bipolar, havendo uma reorganização político-econômico do mundo, iniciando-se, assim, a globalização. Além disso, em 11 de setembro de 2001, houve o ataque às torres gêmeas, nos Estados Unidos, devido a conflitos étnicos e religiosos, com risco de terrorismo na globalização. Assim, após isso, iniciou-se uma reorganização da segurança internacional. E, no fim de 2019, começo de 2020, com a pandemia do Covid-19, o qual colocou em risco a sanidade da humanidade frente à globalização, a organização do sistema de saúde, sanidade e meio ambiente, conhecido como *One Health*, ou seja, saúde única, ficou ainda mais forte. Após a pandemia, então, com a fragilidade da saúde pública frente às zoonoses, o debate global passa a ser com relação à segurança de alimento, defesa sanitária e controle de doenças. Vale ressaltar, também, que além da covid-19, houve algumas epidemias como a da gripe aviária e peste suína africana, os quais também infectaram animais, com risco de zoonoses, afetando, assim, a qualidade e quantidade de alimentos. Dentro deste contexto, é importante diferenciar a “Segurança alimentar” (*Food Security*, ou seja, discussões sociais e políticas em relação à garantia de acesso à alimentação para as populações) da “Segurança do alimento” (*Food Safety*, ou seja, qualidade e sanidade).

Convém salientar que o termo saúde única é antigo. Na Grécia antiga e Egito já se falavam da importância da saúde animal ser interligada à saúde humana. No século 19, o Dr. Rudolf Virchow reconhece a ligação entre a saúde animal e saúde humana. Nos finais dos anos 40, na Região das Américas, foram criados programas de saúde pública veterinária, sendo que havia destaque para algumas zoonoses. No Brasil, o Programa Raiva foi criado em 1973 como um acordo entre o Ministério da Saúde e Agricultura. Posteriormente, em 2004, em Nova York, começou-se o conceito “*One World, One Health*”. Já em 2008, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH, antiga OIE) e Organização Mundial de Saúde (OMS) começaram a desenvolver um

marco estratégico conjunto. Isso porque, todas elas têm estado na vanguarda no desenvolvimento de abordagens baseadas em riscos para a gestão da saúde pública frente ao perigo nos alimentos. Desde que a análise de risco para perigos químicos ficou bem estabelecida, a OMS e a FAO têm voltado a atenção de seus especialistas para a análise de risco dos perigos microbiológicos. Desde então, houveram muitas iniciativas e reuniões, isso porque 70% das ameaças de riscos infecciosos à saúde pública estão na interface com os animais, como os exemplos acima citados, da gripe aviária, peste suína e covid-19.

Cada vez que há um surto, uma epidemia ou mesmo pandemia, ocorre ameaças na interface saúde humana, ambiental e animal, os quais afetam o comércio, turismo e a economia global. Isso porque, a produção de alimentos é um importante “*commodity*” para vários países. Ademais, os eventos de riscos infecciosos podem parar a exportação e o turismo e, apenas rumores de possíveis eventos relacionados à cadeia alimentar podem causar vários danos à economia. Um exemplo disso é que entre os anos de 1995 e 2008, foram estimadas mais de U\$125 bilhões em perdas econômicas em doenças que atingem animais e humanos.

Dessa forma, a OMS revisou o Regulamento Sanitário Animal Internacional, ampliando o mesmo e, assim, os países membros se comprometeram a fortalecer sua vigilância e capacidade de detectar e notificar qualquer possível emergência em saúde pública de preocupação internacional.

Dentre as diferentes doenças passíveis de acontecer, destaca-se as doenças transmitidas por alimentos. Isso porque, o crescimento do comércio internacional de alimentos tem aumentado o risco de transmissão de agentes infecciosos através das fronteiras e ressaltam a necessidade da existência da avaliação de risco internacional para estimar o risco que os patógenos microbianos representam para a saúde humana. A globalização e a liberalização do comércio mundial de alimentos, ao mesmo tempo em que oferece muitos benefícios e oportunidades, também apresenta novos riscos. Em virtude da natureza global da produção, fabricação e comercialização de alimentos, os agentes infecciosos podem ser disseminados do ponto original de processamento e empacotamento até localidades a milhares de quilômetros de distância. Por isso, a abordagem “do campo à mesa” para a segurança de

alimentos destacou que é mais fácil manter os produtos alimentícios livres de contaminação microbiana em uma cadeia de abastecimento se for garantido que os animais sejam livres de infecções e contaminações desde a fazenda. Um exemplo dessa atitude ocorre na Suécia, que atingiu a produção de aves livres de *Salmonella* spp. Para executar esse programa, o país tem um custo anual de cerca de U\$8 milhões; entretanto, comparado com os custos dos tratamentos médicos, estimados em U\$28 milhões, esse valor é baixo. Assim, a falta de segurança dos alimentos gera altos impactos econômicos, onerando as administrações públicas, gerando problemas não mensuráveis, comprometendo a vida e a saúde das pessoas, levando até mesmo a morte.

Assim, doenças transmitidas por alimentos são de grande importância para a saúde pública global, e foram reconhecidas como uma das áreas prioritárias da Organização Mundial da Saúde. Para isso, é importante reavaliar e melhorar os sistemas para a inocuidade alimentar já existentes, ou seja, garantir padrões de segurança alimentar justos, os quais possam ser aplicados em todo o mundo e ajudar todos os países a alcançarem tais padrões, tanto em relação à qualidade microbiológica, mas também nutricionalmente.

Portanto, alguns procedimentos buscando a segurança dos alimentos foram adotados e melhorados nas indústrias, através de programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Porém, ainda é necessário um conhecimento epidemiológico aprofundado sobre doenças de origem alimentar em toda a cadeia de alimentos, em uma perspectiva global, envolvendo tanto governos quanto empresas e também produtores rurais. Ademais, algumas ações estratégicas devem ser realizadas como o monitoramento microbiológico em alimentos, avaliando os riscos, principalmente na produção de novos alimentos, em especial alimentos de animais silvestres, como por exemplo a carne de javali. Ainda, é importante que os países obedeçam à regulamentação internacional do comércio de alimentos, através do *Codex Alimentarius*, um documento que padroniza mundialmente a qualidade microbiológica dos alimentos, criado pela FAO e OMS.

Dentro deste contexto, como já dito, a produção de alimentos seguros é de responsabilidade de todos, do produtor à indústria, o qual deve ter, em todo seu processo de produção, boas práticas de higiene. A indústria, por exemplo,

deverá conhecer qual patógeno alimentar tem a maior probabilidade de estar presente nos ingredientes e, também, o efeito das etapas de processamento na sobrevivência das células microbianas, a fim de orientar as práticas mais apropriadas de processamento.

Para isso, é importante que os métodos de análise microbiológica sejam eficientes e rápidos, como por exemplo o uso de técnicas moleculares. É óbvio que, devido aos diversos métodos de análise adotados por diferentes países, os dados estatísticos de doenças transmitidas por alimentos não são diretamente comparáveis.

Em países em desenvolvimento, por exemplo, há, normalmente, uma subnotificação, não mostrando os reais dados estatísticos de doenças transmitidas por alimentos. Ainda, nestes, existem muitos produtores de alimentos de origem animal de forma clandestina, ou seja, sem fiscalização, tendo, então, uma maior incidência de patógenos e zoonoses.

Paralelamente à esta situação, não pode deixar de ser citado o uso abusivo de antimicrobianos na produção animal. A presença de resíduos destes geram diminuição do rendimento na produção dos alimentos, além de problemas de saúde pública, como resistência a antimicrobianos, choques anafiláticos, dentre outros.

Diante do exposto, o intenso comércio global de alimentos, as viagens internacionais e a circulação de turistas e viajantes a negócios passam a atuar, também, como fatores de risco para o aumento da exposição das pessoas aos agentes patogênicos nativos e aos perigos emergentes. Esses fenômenos, decorrentes do crescente intercâmbio entre bens materiais e povos de diferentes culturas, acentuam-se com a incorporação de novos hábitos alimentares, de mudanças nas preferências dos consumidores e de práticas de processamento de alimentos que, em seu conjunto, definem a nova conformação epidemiológica das doenças de origem alimentar no mundo.

Como produto comercial, os alimentos se apresentam de maneira conflituosa no cenário econômico internacional, pois ao mesmo tempo que se constituem a principal mercadoria do comércio entre os países, tornam-se o veículo mais importante de transmissão de doenças infecciosas, comprometendo o comércio e afetando milhares de pessoas. Assim, a segurança sanitária dos alimentos fica reconhecida como um problema amplo



de saúde pública, passando a representar um desafio transnacional que requer intensa cooperação internacional no estabelecimento de meios efetivos de proteção à saúde das populações, incluindo o fortalecimento dos sistemas de vigilâncias.

Perante isso, a interrelação entre humanos, animais e o meio ambiente nunca foi tão importante quanto atualmente. Desse modo, torna-se indispensável a utilização de uma abordagem coordenativa e multissetorial, como a *One Health* (Saúde Única). Essa iniciativa é definida como um esforço colaborativo de múltiplas disciplinas exercidas localmente, nacionalmente e globalmente, com o objetivo de atingir uma otimização conjugada da saúde humana, animal e do meio ambiente, por meio de políticas, pesquisas, educação e pela prática. Assim, grandes acontecimentos na história acabam impactando na segurança dos alimentos.

## Capítulo 2 - Fatores intrínsecos e extrínsecos, que influenciam a sobrevivência e o desenvolvimento de microrganismos em alimentos

A maioria dos alimentos contém nutrientes suficientes para sustentar a multiplicação microbiana. A qualidade dos produtos de origem animal e de suas matérias-primas representam a contaminação inicial, os quais dependem da higiene na produção da produção destes alimentos, dos ambientes, manipuladores, superfícies e etc. Assim, as bactérias, bolores e leveduras são agentes potenciais de deterioração de alimentos e alguns são patógenos, causando infecções ou intoxicações de origem alimentar, sendo, assim, de importância em saúde pública.

A sobrevivência e a multiplicação destes microrganismos nos alimentos dependem dos chamados fatores intrínsecos e extrínsecos. Tais fatores podem ser ótimos ou limitantes. Portanto, conhecendo-os, é possível controlar a deterioração microbiana e os perigos nos diversos alimentos, estipulando, assim, processos de tratamento adequados para cada tipo de alimento.

Os **parâmetros intrínsecos** são aqueles fatores inerentes ao alimento, que são atividade de água, pH, potencial de oxirredução, nutrientes disponíveis, substâncias naturalmente antimicrobianas, flora microbiana natural, os quais serão descritos abaixo.

- Atividade de água ( $A_w$ )

Atividade de água é a medida da água disponível em uma amostra. A  $A_w$  é a razão entre a pressão do vapor d'água da amostra e a da água pura, à mesma temperatura:

$$A_w = \frac{\text{pressão do vapor d'água da amostra}}{\text{pressão do vapor da água pura}}$$

Vale ressaltar que uma solução de água pura possui um valor de  $A_w$  igual a 1,00. Assim, a adição de solutos reduz o valor de  $A_w$  para menos de 1,00.

O valor de  $A_w$ , em geral, estabelece o valor mínimo em que uma bactéria pode se multiplicar. Quando a  $A_w$  for mínima, a multiplicação da população

bacteriana será mínima; a multiplicação aumentará sempre que aumentar a  $A_w$ . É importante lembrar que em valores mais baixos do que o mínimo, as bactérias não necessariamente serão inativadas, porém isso pode acontecer a algumas porções da população. As bactérias que sobreviverem poderão permanecer inativas, porém ainda serão infecciosas ou deteriorantes de alimentos.

Ainda, no que diz respeito à  $A_w$ , cada alimento possui um valor, porém este não é fixo, isso porque ela pode mudar com o passar do tempo ou variar consideravelmente quando são analisados alimentos similares provenientes de diferentes fontes. Isso pode ser exemplificado quando falamos sobre queijos. Assim que acabam de ser feitos, possuem um valor de  $A_w$ , porém, com o tempo e com a sua maturação, essa  $A_w$  reduz. Além disso, se a produção do queijo for realizado em diferentes propriedades rurais, estes não necessariamente terão a mesma  $A_w$ .

A atividade de água tem sido bastante utilizada como um fator de conservação de alimentos por meio da adição de sal ou açúcar. O açúcar é utilizado tradicionalmente na conservação de produtos com frutas (geleias e conservas). Em contraste, o sal é utilizado na conservação de carnes e peixes. Assim, existem grupos de microrganismos que são particularmente resistentes a baixas  $A_w$ :

- Microrganismos osmofílicos – necessitam de ambiente com baixa  $A_w$ , como produtos açucarados, para se desenvolver.
  - Microrganismos osmodúricos – suportam, mas não necessitam de ambientes com elevada concentração de açúcar.
  - Microrganismos halofílicos – necessitam de ambientes com elevada concentração salina para se desenvolver.
  - Microrganismos halodúricos – suportam ambientes com alta concentração de sal.
  - Microrganismos xerofílicos – afinidade a ambientes secos.
- pH

Cada microrganismo possui um valor ideal de pH, no qual sua multiplicação é máxima. Entretanto, existe uma faixa de pH de cada microrganismo, com valor mínimo (no final ácido da escala) e com valor

máximo (no final básico da escala). Entretanto, saindo da faixa de pH ótimo de um microrganismo e seguindo para ambas as direções, diminui sua multiplicação.

Um alimento pode possuir inicialmente um pH que impeça a multiplicação bacteriana, mas esse valor pode ser alterado pelo metabolismo de outros microrganismos (mofos e leveduras), permitindo, assim, a multiplicação bacteriana.

Os microrganismos podem ser divididos de acordo com o seu pH ótimo entre acidófilos, com crescimento ótimo em pH abaixo de 7; mesófilos: crescimento ótimo em pH em torno de 7; e, alcalófilos: crescimento ótimo em pH acima de 7.

- Potencial de oxirredução (Eh)

O potencial de oxidorredução pode ser definido como sendo a facilidade com que determinado alimento ganha ou perde elétrons. Quando um elemento perde elétrons, ele é dito oxidado, e quando ganha elétrons, reduzido. Microrganismos aeróbios requerem valores de Eh positivos para a multiplicação. Vale ressaltar que fenômenos de oxirredução ocorrem simultaneamente, ou seja, sempre haverá uma molécula perdendo e outra ganhando elétrons, chamado de redox (medido em milivolts - mV).

É importante lembrar que a presença do oxigênio é o fator que mais contribui para o aumento do potencial redox de um alimento. Ou seja, os microrganismos aeróbios requerem Eh positivo (ou seja, presença de O<sub>2</sub>) e são oxidantes (+350 a +500mV). E, dentro deste grupo estão bolores, bactérias como a *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Micrococcus* spp., algumas espécies de *Bacillus* spp., e leveduras oxidativas. Os microrganismos anaeróbios requerem Eh negativo (ou seja, ausência de O<sub>2</sub>) e são redutores (+30 a - 550mV). Neste caso, o oxigênio é tóxico para a célula, porque gera peróxidos letais ao microrganismo. Neste grupo estão os microrganismos do gênero *Clostridium* spp. Ainda, os microrganismos facultativos multiplicam-se em Eh positivo e negativo (+100 a 350mV), ou seja, são oxidantes e redutores, como as leveduras (fermentativas), as enterobactérias e os *Bacillus* spp. Já os microrganismos microaerófilos

multiplicam-se melhor em Eh baixo (as bactérias láticas, por exemplo, encontram-se neste grupo).

- Nutrientes disponíveis

Os alimentos de origem animal oferecem benefícios essenciais para saúde do ser humano, como proteínas, vitaminas e sais minerais. Assim, representam um ambiente ideal para a proliferação de diferentes microrganismos.

Para que a multiplicação microbiana seja possível, os seguintes nutrientes devem estar disponíveis: água, fonte de nitrogênio, fonte de carbono, vitaminas e sais minerais. Assim, de acordo com o tipo de nutrientes que compõe o alimento, pode-se determinar qual o microrganismo que terá maiores possibilidades de se desenvolver. Os bolores, por exemplo, são de particular interesse na deterioração de matérias primas ricas em carboidratos complexos (polissacarídeos), como amido e celulose. E, alimentos ricos em óleos e gorduras sofrem a ação de muitos bolores, leveduras e algumas bactérias.

Vale ressaltar que os microrganismos variam quanto às suas exigências aos fatores de multiplicação e à capacidade de utilizar os diferentes substratos que compõem os alimentos. Para exemplificar, bactérias que possuem enzimas lipolíticas, ou seja, que quebrariam a gordura para a obtenção de energia, teria sua multiplicação ótima em alimentos ricos em gordura, como por exemplo, a manteiga. É importante lembrar que existem, ainda, outros fatores para que as bactérias se multipliquem, como por exemplo, a temperatura.

- Substâncias naturalmente antimicrobianas

A resistência de alguns alimentos frente à multiplicação de alguns microrganismos (bactérias, vírus, fungos e bolores) é devida a presença de algumas substâncias produzidas naturalmente e presentes nesses alimentos. Essas substâncias naturais tem a capacidade de retardar ou até de impedir a multiplicação microbiana.

O ovo, por exemplo, em especial a clara, contém diversos agentes antimicrobianos naturais, como a lisozima, enzima capaz de destruir a parede

celular bacteriana, sendo especialmente ativa em bactérias Gram-positivas. O ovo ainda contém a avidina, a conalbumina e outros inibidores enzimáticos.

Ademais, o leite bovino contém várias substâncias antimicrobianas naturais que podem agir especificamente ou inespecificamente. Encontramos no leite compostos de ação específica como as imunoglobulinas, o fator complemento, os macrófagos e os linfócitos. Ainda, a lactoferrina tem também atividade antimicrobiana. Trata-se de uma proteína que inibe a multiplicação através da retirada de íons de ferro do leite. Outras substâncias como a lisozima, naturalmente presente no leite, e a nisina, produzida por bactérias lácticas no leite, também são importantes no controle do desenvolvimento microbiano.

- Flora microbiana natural

Do ponto de vista microbiológico, considera-se que os alimentos de origem animal estão livres de microorganismos. Entretanto, o peixe, por exemplo, possui microorganismos na pele, brânquias e intestinos. Essa flora microbiana é oriunda das águas onde vivem os pescados, uma vez que estão imersos em um mundo de microorganismos. Estes microorganismos existem dentro do corpo ou sobre ele quantitativa e qualitativamente em equilíbrio biológico. Sua permanência pode ser contínua ou passageira e produzem variações segundo a espécie do animal, habitat, estação do ano e fase do ciclo de reprodução.

Assim, a presença destes pode, muitas vezes, inibir a multiplicação de outros, isso porque, em sua multiplicação, há produção de metabólitos que podem afetar a capacidade de sobrevivência e de multiplicação de outros microorganismos presentes nesse alimento. As bactérias lácticas, por exemplo, produzem o ácido láctico e as bacteriocinas, que inibem ou eliminam certos microorganismos patogênicos do alimento. De outra maneira, alguns tipos de leveduras podem consumir os ácidos orgânicos dos alimentos ácidos, fornecendo condições para a multiplicação daqueles microorganismos que anteriormente tinham sua multiplicação inibida pela acidez.

Os **fatores extrínsecos**, ou seja, não inerentes ao alimento e sim ao ambiente também influenciam a sobrevivência e o desenvolvimento de

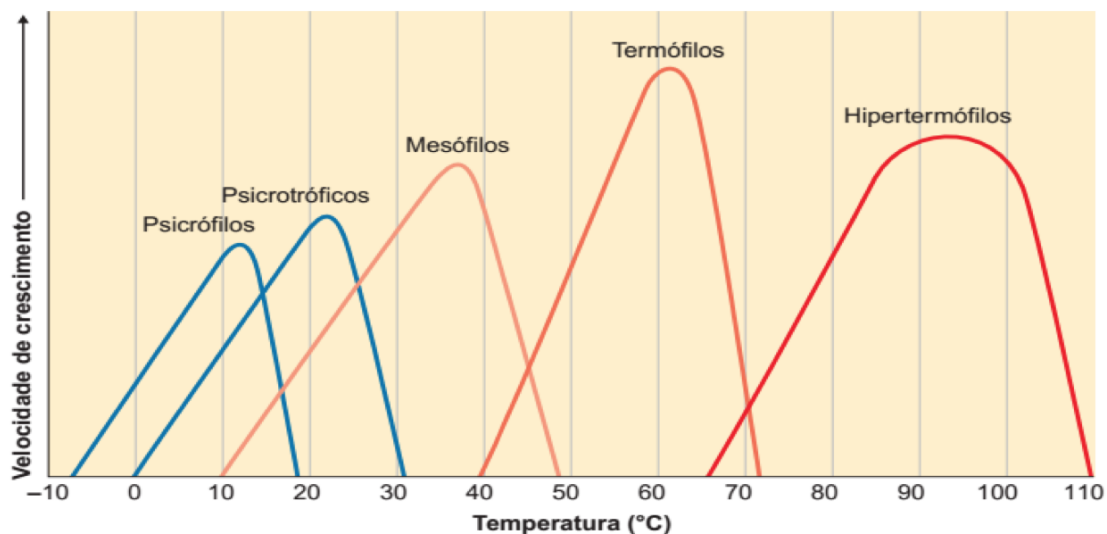
microrganismos em alimentos. Dentre eles pode-se citar a temperatura, umidade relativa do ambiente, luz e composição atmosférica, os quais serão discutidos abaixo.

- Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a multiplicação dos microrganismos nos alimentos. Isso porque, cada um tem sua temperatura mínima, máxima e ótima de multiplicação. A temperatura ótima, por exemplo, é aquela que permite uma multiplicação mais rápida, ou seja, permite que o microrganismo expresse o seu potencial máximo metabólico. Vale ressaltar que cada espécie de microrganismo tem sua temperatura ótima de multiplicação.

Assim, há uma classificação dos microrganismos em relação à sua temperatura ótima de multiplicação. Os termófilos, cuja temperatura ótima é de aproximadamente 60°C, com mínima de 40°C e máximo de até 90°C; os mesófilos possuem temperatura ótima está entre 20 e 40°C, com mínima de aproximadamente 10°C e máxima de aproximadamente 50°C; os psicrófilos possuem temperatura ótima em torno de 10°C, com mínima de aproximadamente -5°C e máxima de 20°C; e, por último, o grupo dos psicrotróficos, com temperatura ótima entre 25 e 30°C, com mínima de aproximadamente -5°C e máxima de 30°C (Figura 1).

Figura 1. Temperatura mínima, máxima e ótima de cada grupo de microrganismos, de acordo com sua temperatura de multiplicação.



Para exemplificar isto vamos falar sobre a temperatura de armazenamento do leite após a ordenha. Antigamente, o leite era ordenhado e colocado em latões, os quais ficavam à espera do caminhão, à temperatura ambiente ou, muitas vezes, até mesmo no sol. Nestas condições, havia grande multiplicação de microrganismos mesófilos, sendo que estes possuem grande quantidade de microrganismos patogênicos. Entretanto, com as novas normativas (atualmente está em vigor a IN 76 e 77), o produtor passou a ser obrigado a refrigerar o leite, favorecendo, assim, a multiplicação de microrganismos psicrófilos, os quais muitos destes são deteriorantes. Para que não haja, então, problemas com leite contendo microrganismos patogênicos ou deteriorantes, o correto é que o leite seja ordenhado em boas qualidades higiênicas!

Vale ressaltar que diversos processos de conservação dos alimentos utilizam temperaturas acima das máximas para inativar os microrganismos. Como foi citado o leite no exemplo acima, o processo de conservação do leite, nesse caso, é a pasteurização. Ademais, a refrigeração ou congelamento também são métodos de conservação de alimentos utilizando a temperatura e, assim, são utilizados em diferentes alimentos, para evitar a multiplicação de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes.

- Umidade relativa do ambiente

A umidade relativa do ambiente influencia diretamente a atividade de água do alimento. Se estocarmos um alimento de baixa atividade de água em ambiente com alta umidade relativa, a  $A_w$  do alimento aumentará, podendo ocorrer deterioração do mesmo.

Vale ressaltar que alguns microrganismos se multiplicam melhor em alimentos que estejam em um ambiente com maior umidade relativa, como por exemplo alguns fungos e leveduras, isso porque a quantidade de água facilita a ocorrência de certas reações químicas.

- Composição atmosférica

A presença de alguns gases é um fator determinante para a multiplicação de diferentes microrganismos. Na presença de oxigênio, por

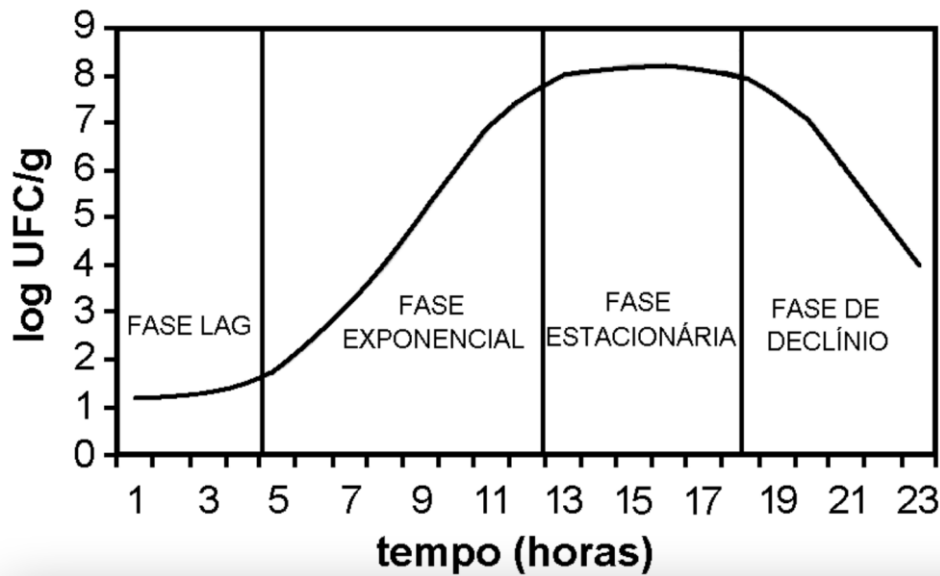


exemplo, multiplica-se microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos. Entretanto, na ausência deste, multiplica-se microrganismos anaeróbios obrigatórios, como por exemplo, o *Clostridium* spp.

A estocagem de alimentos em atmosfera contendo CO<sub>2</sub> é referida como estocagem em “atmosfera controlada”. Muitos países usam essa técnica para estocar frutas, provocando assim o retardamento da maturação e da putrefação causada por fungos, por exemplo. Ainda, muitas carnes são mantidas no vácuo, ou seja, sem a presença de nenhum gás, para evitar, assim, contaminação e deterioração do alimento.

Dentro desse contexto, vale ressaltar que a curva de crescimento típica de microrganismos em alimentos, dependente de todos os fatores acima, é expressa em logaritmo de unidades formadoras de colônia/gramas/hora. Devido à variação da taxa de crescimento microbiano ao longo do tempo pode-se traçar a curva de crescimento. A curva de crescimento pode ser dividida em quatro fases: fase *lag*, fase *log*, ou exponencial, fase estacionária e fase de declínio ou morte celular (Figura 2). A fase *lag* corresponde ao período de tempo em que o número de células sofre pequenas variações, devido ao fato que as bactérias não se reproduzem imediatamente após a inoculação no meio de cultura. A fase *log* ou de crescimento exponencial corresponde ao período em que as células iniciam seu processo de divisão atingindo um tempo de geração constante. É o período de maior atividade metabólica da célula e, portanto, o estágio preferido para fins industriais. Na fase estacionária, o número de indivíduos que morrem é equivalente ao número de células novas e a população se torna estável. A fase de morte celular, ou fase de declínio, corresponde ao período em que o número de mortes excede o número de células novas, até existir uma fração ínfima do original e a população desaparece totalmente.

Figura 2. Curva de crescimento microbiano com as quatro fases.



Fonte: Tortora *et al.*, 2000.

Apesar de a maioria dos fatores mencionados possuir importância considerável, é a inter-relação entre eles que irá definir se haverá ou não multiplicação microbiana em determinado alimento. Uma das vantagens de conhecer essas inter-relações é a prevenção da multiplicação excessiva de microrganismos patogênicos e deteriorantes.

Vale ressaltar ainda que alguns microrganismos são capazes, com alguns limites, de se adaptar a condições de estresse tais como estresse térmico, de pH, choque osmótico e limitação de nutrientes. O mecanismo de sobrevivência mais facilmente encontrado está nos *Bacillus* e *Clostridium* spp. Esses microrganismos formam endósporos sob condições de estresse, os quais podem germinar em futuras condições propícias. Por isso, é importante conhecer os fatores intrínsecos e extrínsecos, pois há a possibilidade de controlar a multiplicação dos microrganismos através dos diferentes fatores envolvidos, criando condições ambientais desfavoráveis como modificações de umidade, temperatura, pH e aplicando certos tratamentos como o calor, o frio, as radiações, etc.

É importante frisar também que a qualidade dos alimentos de origem animal depende, principalmente, da contaminação inicial, ou seja, da higiene na produção da produção destes alimentos. Assim, é imprescindível que estes sejam produzidos com protocolos de boas práticas de fabricação e, também,

tendo sendo um programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

### Capítulo 3 - Principais alterações dos alimentos de origem animal

Na pré-história, as técnicas de conservação de alimentos que predominaram foram o cozimento através do fogo, secagem natural pela ação do sol e a fermentação, descoberta durante o processo de fabricação do queijo. Já na Idade Antiga, foram utilizadas conservas de vinagre e sal, além da defumação e do uso de aditivos, como sal e nitrato, por exemplo, para a conservação da carne.

Com a evolução da tecnologia na Idade Contemporânea, a conservação dos alimentos passou pelo tratamento térmico, em potes de vidros e latas, e presenciou o surgimento da refrigeração e do congelamento em 1850, o que é um verdadeiro marco para o armazenamento de alimentos.

No século XX, com a Segunda Guerra Mundial, o desenvolvimento de alimentos congelados, desidratados e enlatados se intensificou. E, atualmente, encontra-se uma grande variedade de produtos em conserva nas mais variadas modalidades.

A grande quantidade de métodos de conservação de alimentos se deve à variedade de alterações que os alimentos podem sofrer, as quais podem destruir parcial ou totalmente as características dos alimentos e que podem comprometer suas qualidades físico-químicas, a sanidade ou as capacidades nutritivas dos mesmos, tornando-os, desta forma, indesejável ou inadequados ao consumo.

A velocidade e a forma que ocorrem as alterações são influenciadas pela perecibilidade dos alimentos. A perecibilidade é a classificação segundo a resistência aos processos de alterações, principalmente os de origem microbiana. Assim, os alimentos são classificados em perecíveis (perecibilidade alta), semi-perecíveis (perecibilidade média) e não-perecíveis (perecibilidade baixa). Os alimentos de origem animal, por exemplo, são todos de alta perecibilidade, pois são facilmente alterados por microrganismos. E, esta alteração vai desde a simples mudança organoléptica (ou seja, aquelas alterações de odor, paladar e tato) ou até mesmo à putrefação (ou seja, alimento totalmente deteriorado).

Quando o produto é parcialmente alterado e as transformações são de pouca intensidade e se limitam à sua superfície, ele pode ser aproveitado como

matéria-prima para a fabricação de derivados. Mas se a alteração abranger todo o alimento, sua ingestão é inteiramente proibida, ou seja, passa a ser de risco à saúde pública. O leite acidificado é um exemplo de produto que sofre alteração, mas pode ser aproveitado, isso porque ele pode ser usado para a confecção de produtos de panificação e confeitaria. Além disso, o leite talhado também pode ser aproveitado e usado para fazer requeijão, assim como os queijos fora dos padrões exigidos podem ser usados para elaboração de queijos fundidos. Portanto, as alterações que os alimentos podem sofrer refletem diretamente sobre suas características sensoriais, composição química, estado físico e valor nutritivo.

As alterações que os alimentos podem sofrer são classificadas em: **biológicas, físicas, químicas** (enzimáticas ou não enzimáticas) e **nutricionais**. Vale ressaltar que essas alterações podem ocorrer individualmente ou de forma combinada, ou seja, diferentes alterações ao mesmo tempo. E, a ação destes fatores pode ser favorecida por várias circunstâncias e podem ser agrupadas como falhas na coleta e obtenção do produto alimentício, omissões na elaboração do produto (principalmente nas etapas de manuseio e armazenamento de matéria prima), incorreções nos processos de preservação, inadequação do material de envasamento, impropriedades do transporte.

Com relação às alterações nos alimentos, a principal causa é a alteração biológica. Esta é resultante da ação de microrganismos vivos, que pode ser benéfica (ou seja, microrganismos fermentadores que são usados para a produção de pão, cerveja, iogurte entre outros) ou maléfica (microrganismos patogênicos ou deteriorantes).

Dentro das alterações biológicas inclui-se os bolores, também conhecidos como mofos. Estes são microrganismos multicelulares e, curiosamente, o crescimento destes não pode ser visto a olho nu, entretanto, as alterações que eles causam podem ser observadas nos alimentos, principalmente na cor, consistência e/ou estruturas que parecem algodão, envolvendo o alimento. Alguns, entretanto, são usados na fabricação de alimentos de origem animal, como, por exemplo, na maturação de queijos, como o queijo tipo gorgonzola.

Ademais, outros importantes microrganismos são as leveduras, os quais são microrganismos unicelulares, como a *Saccharomyces cerevisiae*, que pode ser usado na maturação superficial de queijos, tendo capacidade antifúngica, inibindo a multiplicação de fungos deteriorantes.

Além de bolores e leveduras, as bactérias também podem causar alterações nos alimentos. Estas, assim como nos outros microrganismos, também podem ser benéficas como por exemplo os *Lactobacillus* spp. que fermentam o açúcar presente no leite, a lactose, e são usados na elaboração de derivados do leite, como o iogurte. Entretanto, além das bactérias benéficas, existem as maléficas, que são patogênicas e/ou causam deterioração de alimentos. Entre as patogênicas estão as *Salmonellas*, importantes causadoras de infecções alimentares, principalmente relacionados ao consumo de maionese produzidas com ovos crus, frangos malcozidos, entre outros; o *Clostridium* spp., relacionados à intoxicações alimentares principalmente em alimentos enlatados como sardinhas; a *Escherichia coli* que faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes e indicam que o alimento está contaminado por fezes, podendo causar importantes toxi-infecções alimentares, entre outros. Com relação à deterioração de alimentos, é importante frisar que os microrganismos deteriorantes, diferente dos patogênicos, causam alterações visíveis nos alimentos, como o estufamento de caixas de leite, manchas verdes em carnes, vermelhidão no pescado e produção de gás em salames italianos. A *Pseudomonas* spp., por exemplo, é um grupo de microrganismo relacionado com deterioração de produtos de laticínios e pescados, por exemplo.

Vale ressaltar que os alimentos sujeitos a processos de subdivisão (moídos, triturados, picados), submetidos a repetidos contatos manuais e aqueles preparados com vários ingredientes (pastéis, bolinhos, empadas, doces com recheios, principalmente à base de creme) são alimentos que, por sua própria constituição, são mais vulneráveis às diferentes contaminações.

As alterações de ordem física são decorrentes de agentes mecânicos que causam danos como quebras, deformações, perfurações, cortes, alterações ocasionadas por falhas operacionais (como queimaduras, subprocessamento), armazenamento e manuseio deficientes dos alimentos. Além disso, agentes como ar, luz, calor, frio podem causar alterações sensoriais ou mesmo na aparência dos alimentos, que os tornam inaceitáveis

para o consumo humano. Um exemplo é o ovo quebrado em uma cartela ou um pescado perfurado (que também ficam sujeitos à uma alteração biológica, ou seja, à facilidade de contaminação microbiana) ou mesmo a carne escura, causada por hematomas ou lesões traumáticas nas carcaças de bovinos. Ainda, a mordida de um rato pode causar dano físico e, concomitantemente, pode levar à alteração biológica, pois o mesmo pode veicular a *Leptospira* spp., agente causador da leptospirose.

As alterações químicas, como já ditas, podem ser não enzimáticas e enzimáticas. As não enzimáticas são o ranço oxidativo e o escurecimento químico dos alimentos. O ranço oxidativo ocorre através da autooxidação. Nesta, a presença de fatores internos e externos como luz, altas temperaturas e presença de íons metálicos (principalmente ferro, cobre e zinco) dá início a um processo, gerando instabilidade nas insaturações dos ácidos graxos, possibilitando a quebra destas e permitindo a formação de radicais livres. Posteriormente, a reação é acelerada pelo oxigênio e há, então, produção de odores desagradáveis, em decorrência da transformação das cadeias de ácidos graxos insaturados formando aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois e hidrocarbonetos. Por ser uma reação que ocorre em alimentos contendo ácidos graxos, ela ocorre principalmente em alimentos ricos em gorduras, como por exemplo a manteiga e margarina.

O escurecimento químico, outro tipo de reação química não enzimática ocorre devido à uma série de reações químicas que culminam com a formação de pigmentos escuros. Para os alimentos de origem animal, destaca-se a reação de Maillard. Esta é uma reação química entre um aminoácido ou proteína e um carboidrato redutor, obtendo-se produtos que dão sabor, odor e cor aos alimentos. Neste caso, a temperatura, o pH, a atividade de água, a natureza do carboidrato e dos aminoácidos, a presença de fosfato e citrato são fatores catalisadores. Um exemplo de alimento é a cor dourada em alimentos assados, como por exemplo, linguiças, ou a cor castanho caramelada na produção de doce de leite, sendo que, em ambos os casos, a temperatura é o fator catalisador da reação.

Com relação às alterações químicas enzimáticas, estas acontecem por enzimas presentes nos próprios alimentos ou produzidas por microrganismos que estão presentes nos alimentos. Ao contrário das alterações microbianas,

que podem tornar os alimentos perigosos para o consumo, as alterações enzimáticas raramente lhe conferem nocividade, porém podem mudar a cor, aroma ou textura do alimento. As enzimas mais importantes na tecnologia de alimentos são as amilases, lactases, proteinases e as oxidases.

Por meio de ações de proteinases, por exemplo, determinados produtos apresentam sabor amargo em decorrência da hidrólise de proteínas e peptídeos presentes nos alimentos. Já as enzimas lipolíticas causam a hidrólise da gordura, dando origem ao ranço (neste caso, então, causado por enzimas). Microrganismos como *Pseudomonas* spp., por exemplo, podem produzir enzimas lipolíticas e/ou proteolíticas em alimentos, causando degradação de gorduras e proteínas (Figura 3). Em contrapartida, algumas cepas de bactérias lácticas de produtos cárneos fermentados sintetizam proteases e lipases que contribuem para a formação do aroma e promovem alterações desejáveis na textura e *flavour* do produto.

Figura 3. Leite degradado por lipases e proteases, de *Pseudomonas* spp..



Fonte: Arquivo pessoal

Por último, pode ocorrer, com os alimentos de origem animal, alterações nutricionais, causadas, por exemplo por aumento da temperatura ou por



cozimento dos alimentos. Ou seja, a pasteurização e o processamento em temperatura ultra-alta (UHT) reduzem o valor nutritivo do leite, pela destruição ou remoção parcial de seus nutrientes, sendo que o leite pasteurizado, pelas características do processo ao qual é submetido, possui menores perdas de nutrientes que o leite UHT, porém estas perdas nutritivas são, na maioria dos casos, pequenas e pouco importantes. Já em relação ao leite esterilizado pelo sistema convencional, as perdas neste caso são maiores, pois as modificações nutritivas variam consideravelmente em função da severidade do tratamento.

Sabendo da facilidade de alterações nos alimentos de origem animal, é importante que se conheça, também, as formas de conservação de alimentos. São elas:

- Refrigerar (-1 a 10° C);
- Esterilizar - tem por finalidade a destruição total dos microrganismos presentes. Com isso, implica na eliminação dos esporos bacterianos. Para isso, são necessários temperaturas elevadas, acima de 100°C, o que se consegue com o uso das autoclaves, que trabalham com o calor sob pressão.
- Enlatar os alimentos;
- Congelar;
- Secar ou desidratar (no sol ou em fornos, com altas temperaturas);
- Liofilizar - neste caso, a água é removida dos alimentos ainda congelados, após um resfriamento de, em média, -30°C; posteriormente o alimento é colocado em uma câmara de vácuo com calor aplicado lentamente e a água congelada evapora sem passar pelo estado líquido);
- Fermentar - baseia-se na modificação das características da matéria-prima, por ação de microrganismos, dando origem a um produto mais estável em decorrência de compostos produzidos durante a fermentação (ácido láctico; ácido acético; etanol); os ácidos, muitas vezes, atuam provocando a inibição dos microrganismos, inclusive os patogênicos.
- Pasteurizar;
- Salgar - evita a multiplicação de microrganismos; o sal provoca a diminuição da  $A_w$  dos alimentos, aumentando a conservação, assim, os

alimentos salgados podem ser mantidos a temperatura ambiente (bacalhau; charque);

- Uso do açúcar – este aumenta a pressão osmótica, diminuindo a  $A_w$ , criando um ambiente desfavorável para multiplicação das bactérias e para alguns bolores e leveduras, exemplo geleias; doces; frutas cristalizadas; leite condensado; mel e etc.
- Defumar (neste caso, os diferentes compostos da fumaça conferem as características sensoriais dos produtos defumados, como presunto e bacon, por exemplo);
- Usar conservantes ou aditivos químicos (como antioxidante ou acidulantes);
- Maturar (ou curar);
- Usar radiação (com raios X, raios gama, raios UV ou feixe de elétrons); embalagens a vácuo;

Vale ressaltar que estas técnicas podem ser usadas isoladamente ou de forma conjunta, buscando, sempre, a conservação e a qualidade do alimento. Além disso, aumenta-se, também, o tempo de prateleira, ou seja, a validade do produto. Assim, com a larga produção de alimentos impulsionada pelas indústrias, diferente do que acontecia na pré-história, Idade Antiga, a conservação de alimentos, tornou-se um ponto importante para evitar doenças alimentares, desperdício e prejuízo.

## **Capítulo 4 - Colheita, transporte e preparo de amostras de alimentos destinadas a exames microbiológicos e físico-químicos**

A segurança dos alimentos tornou-se uma preocupação constante em todo o mundo, levando órgãos governamentais e não governamentais de saúde de diversos países a buscar métodos para garantir a distribuição de um alimento seguro, promovendo a saúde do consumidor final. Além disso, os consumidores ao redor do mundo têm ficado cada vez mais exigentes, tanto com os alimentos quanto com qualquer outro produto. Desse modo, a análise de alimentos e o controle de qualidade na produção se fazem essenciais.

Com o intuito de garantir alimentos mais seguros e mais saudáveis, a indústria tem colocado em prática uma série de planos e ações, entregando os melhores produtos ao fim da cadeia. Sendo assim, com a necessidade que a indústria alimentar tem de prover alimentos ainda mais saudáveis e de maior qualidade, a análise de alimentos fornece informações sobre as mais diversas características dos alimentos, como composição, valores nutricionais, propriedades físico-químicas e, principalmente, a microbiológica, visando, assim, a segurança.

Microrganismos como bactérias, leveduras, fungos e alguns protozoários são comumente encontrados em alimentos, principalmente as bactérias. Como dito no capítulo anterior, alguns deles causam a deterioração dos alimentos, ao mesmo tempo que outros podem prevenir o crescimento de organismos capazes de causar doenças. Entretanto, muitos deles são patogênicos e são um problema sério de saúde pública.

Uma atividade nobre, a análise de alimentos também é um grande desafio. Isso porque, como todo o mundo, a indústria de alimentos passa por transformações constantes. A economia, estilos de vida, hábitos alimentares, expectativa de vida e outras variáveis vão se moldando. E, junto delas, os agentes causadores de doenças provenientes dos alimentos também mudam, dando origem a novas doenças.

No Brasil, existe uma série de agências governamentais que regulamentam a composição e a qualidade dos alimentos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são duas das principais. Entre essas legislações está a

Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº. 331, publicada em 23 de dezembro de 2019. E, junto com a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece os novos padrões microbiológicos (critérios que definem a aceitabilidade de um lote ou processo) para alimentos e passa a vigorar no dia 23 de dezembro de 2020. Esta determina que os alimentos não podem conter microrganismos patogênicos, toxinas ou metabólitos em quantidades que causem danos à saúde. A presente resolução não deve ser empregada em investigação de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), o que deve ser realizada conforme orientações e procedimentos estabelecidos no Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos do Ministério da Saúde.

Assim, os setores envolvidos na cadeia produtiva de alimentos são responsáveis por realizar avaliações periódicas quanto à adequação do processo para atendimento aos padrões e determinar a frequência das análises, assegurando que, durante todo o prazo de validade, os alimentos cumpram os padrões microbiológicos estabelecidos pela IN 60/2019, em conformidade com as boas práticas de fabricação (BPF) e outros programas de controle de qualidade. Estão são úteis nas mais diversas etapas da produção de alimentos. Portanto, um dos grandes objetivos da análise de alimentos, senão o principal, é garantir que os melhores produtos, seguros, nutritivos e desejáveis, cheguem até os consumidores.

Assim, além de padrões regulamentados, existe um padrão, também, para amostragem, colheita, transporte e preparo de amostras de alimentos destinadas a exames microbiológicos e físico-químicos. E, as recomendações contidas nesse capítulo são da *American Public Health Association* (APHA), descritas na 5ª edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Salfinger & Tortorello, 2015), na 22ª edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt, 2012) (específicas para a análise de água), na 17ª edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004) (específicas para a análise de produtos lácteos) e em diversas normas da *International Organization for Standardization* (recomendadas para ensaios realizados com metodologia ISO).

O primeiro passo é então a amostragem, quando se fala em lotes grande que são enviados para análises. A tomada de decisão de quantas unidades de amostra deverão ser analisadas, deve seguir um plano de amostragem estatístico adequado. Os mais utilizados são os planos de duas ou três classes estabelecidos pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 2002), adotados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O plano de duas classes classifica os lotes em duas categorias, aceitável ou inaceitável, dependendo dos resultados da análise das n unidades de amostra. Este plano é o aplicado no caso de ensaios de presença/ausência, como *Salmonella* spp., por exemplo, em que a ausência é aceitável e a presença em qualquer das n unidades de amostra é inaceitável. Já o plano de três classes classifica os lotes em três categorias, aceitável, qualidade intermediária, mas aceitável e inaceitável. E, são recomendados para ensaios quantitativos, ou seja, que existe uma faixa de limite aceitável.

Vale lembrar que a unidade de amostra geralmente contém uma quantidade de produto maior do que a necessária para a análise, porque, ao se coletar uma unidade de amostra, há sempre o cuidado de se tomar quantidades suficientes para estocagem de contra-amostras e prevenção de perdas por acidente. Já a unidade analítica é a quantidade de alimento efetivamente utilizada na realização de um ou mais ensaios da unidade de amostra. O número de unidades analíticas necessárias para a análise depende do número e tipos de ensaios que serão realizados na mesma unidade de amostra, sendo uma para os ensaios gerais de quantificação (contagem total de aeróbios mesófilos, contagem de bolores e leveduras, contagem de coliformes totais/termotolerantes/*E. coli*, contagem de *S. aureus*, contagem de *B. cereus*, contagem de *C. perfringens*), uma para cada ensaio de presença/ausência (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e todos os outros que requeiram enriquecimento em caldo específico) e uma para cada outro ensaio que requeira tratamento diferenciado da amostra (contagem de esporos de bactérias, contagem de bolores termorresistentes, entre outros).

O material necessário para as coletas são: frascos ou sacos plásticos estéreis e utensílios estéreis para coleta de diferentes capacidades, com tampas à prova de vazamento; espátulas e/ou facas e/ou colheres e/ou

tesouras e/ou Pinças, caixas de isopor com gelo seco ou sachês de gelo reutilizável; etanol 70% e/ou solução de hipoclorito de sódio a 100 mg/l (100ppm); tubos de ensaio com água peptonada 0,1% e/ou com caldo infusão cérebro coração (BHI), com tampas à prova de vazamento, sendo que todos os materiais devem estar estéreis antes da coleta, ou seja, autoclavados à uma temperatura de 121°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ) por pelo menos por 15 minutos (alguns outros métodos que podem ser utilizados como alternativa de esterilização são a flambagem em chama, a imersão em etanol e combustão do álcool e o tratamento com soluções desinfetantes, porém deve haver enxague para que não haja resíduos). Vale lembrar que a recomendação é que amostras de alimentos acondicionadas em embalagens individuais sejam coletadas e encaminhadas ao laboratório na sua embalagem comercial original, fechada e intacta. Não se pode esquecer, também, de etiquetas e canetas para a correta identificação das amostras.

Antes da coleta iniciar, a amostra deve ser homogeneizada (ou, se não for possível, como em queijos, retirar porções de diferentes partes da amostra; no caso de alimentos congelados, como bloco de pescados, pode-se utilizar uma furadeira elétrica, com a broca previamente esterilizada), para garantir que a distribuição dos microrganismos seja homogênea. Retirar então, com utensílios ou instrumentos adequados, a quantidade de produto necessária para compor a unidade de amostra. É importante lembrar que os frascos de coleta não devem ser completamente preenchidos pelo alimento, sendo recomendável utilizar, no máximo, três quartos de sua capacidade, para facilitar a posterior homogeneização da amostra e devem ser abertos apenas o necessário para introduzir o produto e fechar imediatamente. Ainda, a pessoa que faz a coleta deve estar ciente dos cuidados necessários para sua própria proteção, pois a amostra pode conter microrganismos patogênicos e a pessoa pode se infectar.

Para a coleta de água ou outros líquidos, retirados através de torneiras ou tubulações, limpar a parte externa da saída com etanol 70%, flambar (se o material for resistente ao fogo), e deixar escoar uma certa quantidade do produto, antes de iniciar a coleta. Isso vai promover uma lavagem da tubulação e remover os resíduos acumulados ou, no caso de poço, bombear a água por 5 a 10 minutos, para estabilizar a temperatura da água antes da coleta. E, no

caso de coleta de água de cisternas, por exemplo, não entrar com o frasco de coleta, mas sim utilizar um utensílio adequado para retirar as unidades de amostra (se necessário, colocar um frasco de coleta com água para contrapeso). Vale lembrar, também, que amostras de água clorada devem ter o cloro residual neutralizado imediatamente após a coleta, para impedir a continuação do seu efeito bactericida sobre a microbiota presente. Para tanto, adicionar aos frascos de coleta, antes da esterilização, 0,1 mL de uma solução 3% de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), para cada 100 ml de amostra que se pretende coletar (para neutralizar 5 mg de cloro residual por litro de amostra).

Para a amostragem de manteiga e produtos similares, a ISO 6887-4:2017 recomenda remover a camada externa (3 a 5mm) e retirar as unidades de amostra com um amostrador tipo “corer” esterilizado, introduzindo-o na diagonal, sem atingir o fundo.

O transporte das amostras deve ser realizado da mesma forma como o produto é normalmente transportado e estocado na sua comercialização. Alimentos desidratados, secos ou concentrados são estáveis microbiologicamente, podendo ser transportados e estocados à temperatura ambiente. Devem, entretanto, ser protegidos contra a umidade. Amostras de alimentos comercializados na forma congelada devem ser transportadas e mantidas congeladas até o momento da análise, não podendo sofrer descongelamento total ou parcial durante o transporte (neste caso, a temperatura ideal é de  $-20^\circ\text{C}$  e o transporte deve ser feito em caixas de isopor com gelo seco, porém, o produto não deve entrar em contato com o gelo seco para não haver alteração físico-química e microbiológica da amostra). Para produtos refrigerados, recomenda-se que transporte e estocagem seja entre 0 e  $4^\circ\text{C}$ , em caixas de isopor com gelos recicláveis e intervalo máximo de 36 horas entre a coleta e a análise (na impossibilidade de se proceder à análise no intervalo de tempo preconizado, as amostras devem ser congeladas e mantidas nas mesmas condições descritas para amostras congeladas).

Ainda, alimentos comercialmente estéreis, com embalagens em condições normais, podem ser transportados e estocados à temperatura ambiente, devendo ser protegidos contra exposição a temperaturas superiores a  $40^\circ\text{C}$ . E, o transporte de coletas de água pode diferenciar, dependendo da origem da amostra. Para águas engarrafadas em embalagens originais,

lacradas, o transporte e estocagem pode ser feita à temperatura ambiente, ou seja, sem necessidade de refrigeração. Para amostras transferidas para outros frascos, transporte e estocagem sob refrigeração (temperatura menor que 8°C, porém sem congelar) e intervalo entre coleta e análise preferencialmente de 8h, não devendo ultrapassar 24h.

Na recepção de amostras para análise no laboratório, devem ser observadas as condições da embalagem e as condições em que foi feito o transporte, antes da aceitação do pedido de análise. Deve ser recusada qualquer amostra com embalagem rasgada, furada, violada, com corpos estranhos ou qualquer outro tipo de defeito, bem como amostras transportadas sob condições inadequadas (se a embalagem tiver sido violada, comum no caso de amostras encaminhadas para responder à reclamações de consumidores, por exemplo, pode-se proceder à análise, porém, as condições em que a amostra foi recebida devem constar da identificação da amostra e do laudo final de análise).

Posteriormente, no laboratório, antes de iniciar as análises, recomenda-se que sejam observados alguns cuidados, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas e sem que haja alteração das características físico-química do alimento:

- A área de trabalho deve estar limpa, com portas e janelas fechadas, para evitar correntes de ar;
- Desinfetar todas as superfícies de trabalho com um desinfetante adequado (etanol 70%, por exemplo);
- O material necessário deve estar disponível nas bancadas;
- Lavar as mãos e desinfetar com um desinfetante adequado ao contato com a pele;
- Trabalhar em ambiente estéreis, em capelas de fluxo laminar vertical ou próximo à chama de um bico de Bunsen;
- Nunca pipetar com a boca;
- Materiais usados e contaminados devem ser descartados em lugares apropriados e não sobre as bancadas;



- Esterilizar os utensílios utilizados na abertura das embalagens e retirada das unidades analíticas (tesouras, pinças, facas, espátulas, colheres etc.) e também a área externa das embalagens com etanol 70%;
- Qualquer anormalidade (como estufamento, vazamento, presença de corpo estranho, entre outros) deve ser anotada;
- Não pode haver outras substâncias (alimentos, bebidas, entre outros) em cima das bancadas, com exceção daquelas que serão utilizadas nas análises;
- Deixar equipamentos calibrados e testados (como por exemplo estufas ou equipamentos de análises físico-químicas como crioscópio);
- Todos os reagentes para as análises-físicos químicas devem estar separados e organizados para facilitar as análises;
- Identificar todos os tubos e placas que serão inoculados, com o código da amostra, a diluição e a sigla do meio de cultura contido.

Antes do início das análises, após a observação dos pontos acima citados, deve-se homogeneizar o conteúdo para a retirada da unidade analítica. No caso de amostras líquidas acondicionadas em frascos com espaço suficiente para a agitação, inverter a embalagem 25 vezes (se o frasco apresentar mais de 2/3 do espaço preenchido, inverter 25 vezes num arco de 30cm, em sete segundos e, se não houver espaço livre para agitação, utilizar um segundo frasco, estéril e transferir a amostra de um frasco para o outro, por três vezes). Caso haja formação de espuma, aguardar que esta se disperse. Posteriormente, retirar a unidade analítica com uma pipeta, inserida numa profundidade não maior do que 2,5cm abaixo da superfície do líquido.

Em amostras sólidas, retirar diferentes porções das diferentes áreas ou homogeneizar todo o conteúdo da amostra no aparelho *stomacher* e retirar a unidade analítica do macerado.

No caso de amostras congeladas, recomenda-se descongelar sob refrigeração (<4,4°C) por não mais de 18 horas, na embalagem original. Alternativamente, podem ser usadas temperaturas mais altas, mas não superiores a 40°C e por não mais do que 15 minutos. Nesse caso, é requerida a agitação frequente da amostra, para facilitar o descongelamento. O uso de um banho com temperatura controlada e agitação é recomendável. Blocos de alimentos

congelados, que não podem ser descongelados recomenda-se o uso furadeira elétrica, como já comentado.

Para alimentos cuja contaminação é predominantemente superficial, como carcaças de bovinos, suínos, aves e peixes, utiliza-se a técnica do esfregação de superfície (assim como análises em mesas, equipamentos, utensílios e embalagens). Este pode ser feito com “swabs” estéreis ou, se a área amostrada for grande, com esponjas estéreis. Estes, então, deverão ser inseridos em tubos ou frascos contendo 10 ml de um diluente adequado, como a Água Peptonada 0,1%,

Para amostras de alimentos de contaminação predominantemente superficial, como carcaças de aves inteiras, cortes de aves, peixes, cascas de ovos, utiliza-se a técnica da lavagem superficial.

Vale lembrar que deve-se retirar uma unidade analítica para cada ensaio de presença/ausência com enriquecimento em caldo específico, como por exemplo o isolamento de *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes*. Ainda, deve-se retirar uma unidade analítica para os ensaios gerais de quantificação, ou seja, aqueles que envolvem contagem, como a contagem total de aeróbios mesófilos ou psicrótróficos, a contagem de bolores e leveduras, a contagem de coliformes totais/termotolerantes/*E. coli*, entre outros. E, cada unidade analítica equivale a 25 gramas ou mL da amostra. Além disso, o intervalo entre a homogeneização e a retirada da unidade analítica não deve ultrapassar 15 minutos.

É preciso considerar que, depois da retirada da(s) unidade(s) analítica(s), é importante que haja material suficiente para repetir as análises, caso necessário. Preferencialmente, que haja amostra intacta. Porém, se não for possível, o material remanescente deve ser estocado nas mesmas condições utilizadas antes da análise (para produtos refrigerados deve-se congelar, porém, na interpretação dos resultados, deve levar em consideração o fato de que a população do(s) microrganismo(s) alvo pode ter diminuído em razão do congelamento; se as amostras tenham sido coletadas pela técnica do esfregação de superfície ou da lavagem superficial, deve-se congelar como contra-amostra a parte não utilizada do diluente em que foram recolhidos os contaminantes. Acrescenta-se, ainda, que o descarte final das amostras pode ser feito no lixo, porém, aquelas com suspeitas de conter microrganismos

nocivos à saúde devem ser descontaminadas em autoclave (121°C/30min) antes do descarte.

Para as análises microbiológicas, em seguida, deve-se preparar a amostra para a primeira diluição da unidade analítica. Neste caso, recomenda-se o uso de água peptonada 0,1% para alimentos em geral. Ademais, a diluição inicial recomendada para a maioria das amostras é de 1:10. Ou seja, a primeira diluição  $10^{-1}$  será 25 gramas ou mL da amostra em 225 mL de água peptonada 0,1%. Posteriormente, para a diluição  $10^{-2}$ , retira-se 1 mL desta primeira diluição, após devida homogeneização (amostras sólidas devem passar no aparelho *stomacher* por 1 a 2 minutos e, amostras líquidas devem ser vertidas 25 vezes), e adiciona-se em 9 mL de água peptonada 0,1%, assim sucessivamente até a diluição desejada (o número de diluições necessárias depende do nível de contaminação esperado. Esta preparação e inoculação de diluições seriadas da amostra é requerida nos ensaios quantitativos, para reduzir o número de microrganismos por unidade de volume, permitindo a contagem. Ainda, recomenda-se, também, que, para evitar injúrias aos microrganismos por choque térmico, a temperatura do diluente seja a mesma do ambiente.

Posteriormente, deve-se, então, inocular as diluições e/ou amostras nos meios de cultura específicos para cada microrganismo ou grupo de microrganismo. Para isso, padrões de qualidade microbiológica e físico-químicas estão descritos, como já comentado, na RDC nº. 331, publicada em 23 de dezembro de 2019 e na Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Assim, busca-se padronizar a qualidade microbiológica, na busca de microrganismos como bactérias, leveduras, fungos e alguns protozoários, comumente encontrados em alimentos, e, melhorar a qualidade sanitária do alimento e, também sua vida de prateleira.

Ainda, é importante que seja feito o controle de qualidade de todos os ingredientes utilizados num processamento de alimentos. Assim, nas indústrias alimentícias, mesmo o produto animal sendo o ingrediente principal, outros produtos, tais como sal, açúcar, ácidos, condimentos, material de embalagem etc., também devem ser controlados.

Nesse sentido, a análise físico-química do alimento é de grande importância, pois tem a função de proteger o produtor e o consumidor,

garantindo a fabricação de um alimento de excelente qualidade. O objetivo é oferecer um produto em condições de cumprir a finalidade de alimentar e nutrir, com uma qualidade padrão, boa e constante desde a produção até o consumidor.

Assim, obtém-se, com as análises microbiológicas e físicos-químicas padrões de identidade e qualidade dos produtos de origem animal, chegando à mesa do consumidor um alimento seguro e de qualidade.

## Capítulo 5 - Microrganismos indicadores em alimentos

Alimentos são facilmente contaminados com microrganismos na natureza, durante manipulação, processamento, transporte ou armazenamento. Após ter sido contaminado, o alimento de origem animal serve como meio de cultura para o crescimento de microrganismos, isso porque, contém grande quantidade de nutrientes. Se esses microrganismos tiverem condições de se multiplicar (temperatura ideais, quantidade de água suficiente, entre outros fatores já discutidos), podem mudar as características físico-químicas do alimento e, assim causar sua deterioração ou mesmo diminuir a produtividade do mesmo ou de seus derivados. Além disso, eles também podem veicular microrganismos patogênicos e ser responsáveis por intoxicações e infecções transmitidas por alimentos.

A análise microbiológica, para se verificar quais e quantos microrganismos estão presentes no alimento, é fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, os riscos que o alimento pode oferecer à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida útil pretendida. Essa análise é indispensável também para verificar se os padrões e especificações microbiológicos para alimentos, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidos adequadamente.

Para isso, então, existe a análise de microrganismos indicadores. Estes são, então, grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a presença de patógenos ou sobre a deterioração do alimento. Além disso, podem indicar condições sanitárias do processamento, produção ou armazenamento.

Assim, como exemplos de grupos de microrganismos indicadores podem ser citados aqueles que, segundo a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), podem ser agrupados em: microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde (mesófilos, psicotróficos, termófilos, bolores e leveduras); microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes termotolerantes (antes conhecidos como coliformes fecais, os quais estão os grupos

enterococos, enterobactérias e *Escherichia coli* não patogênicas), os quais serão discutidos abaixo.

- **Microrganismos aeróbios heterotróficos mesófilos**

Os mesófilos são microrganismos que possuem temperatura ótima entre 20 e 40°C, com mínima de aproximadamente 10°C e máxima de aproximadamente 50°C. A contagem de microrganismos aeróbios heterotróficos mesófilos funciona como um indicador de qualidade de alimentos, isso porque, quando o alimento possui uma população elevada deste grupo de microrganismos, aumenta a probabilidade da existência de bactérias patogênicas, sendo que a maioria das bactérias patogênicas são mesófilas. Além disso, a análise é útil porque dá indícios das condições de limpeza e desinfecção, do controle da temperatura ao longo dos processos de tratamento industrial, conservação, transporte e armazenamento e também permite estimar a vida útil do produto.

A ICMSF estabelece que populações de aeróbios heterotróficos mesófilos não devem ser superiores a  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> da amostra analisada, entretanto, existem estudos que falam que valores acima de  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> são considerados inadequados em alimentos a base de peixes marinhos crus, por exemplo.

Em alimentos deteriorados, espera-se um número elevado de microrganismos heterotróficos mesófilos, variando de acordo com o tipo de alimento e microrganismo presente. Entretanto, vale lembrar que alimentos fermentados apresentam população microbiana de, aproximadamente,  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> sem, no entanto, serem considerados deteriorados.

Assim, os mesófilos permitem obter informação sobre a alteração incipiente dos alimentos, sua provável vida útil, a falta de controle no descongelamento dos alimentos ou desvios na temperatura de refrigeração estabelecida.

- **Microrganismos aeróbios psicrotróficos**

Os psicrotróficos é o grupo de microrganismos com temperatura ótima entre 25 e 30°C, com mínima de aproximadamente -5°C e máxima de 30°C. A

contagem total de microrganismos aeróbios psicrotróficos avalia o grau de deterioração de alimentos refrigerados.

Os psicrotróficos não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos, apresentando aproximadamente 15 gêneros diferentes que foram isolados de diferentes alimentos. Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos; assim como microrganismos aeróbios e anaeróbios.

Fazem parte deste grupo tanto bactérias Gram-negativas – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp, como bactérias Gram-positivas – *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Dentre estes gêneros, o mais comumente isolado é a *Pseudomonas*, sendo que sob condições de refrigeração este gênero rapidamente predomina sobre a microbiota de alimentos. Atualmente, com a nova legislação sobre leite que obriga que os produtores refrigerem o leite após a ordenha, quando esta é realizada com má qualidade higiênica, esse grupo de microrganismos encontra fatores ideais para sua multiplicação (antes, o problema do leite eram microrganismos mesófilos, pois não eram refrigerados). Assim, com essa contaminação e a facilidade de multiplicação dos psicrotróficos, relata-se, por parte das indústrias, diminuição da produtividade para produção de derivados.

Vale ressaltar, também, que existem microrganismos psicrotróficos termodúricos, ou seja, que são capazes de resistir a temperaturas similares às do processo de pasteurização (72 a 74°C) e possuem capacidade de crescimento em temperaturas de 4 a 7°C. Pertencem a este grupo os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Corynebacterium*. Devido ao fato deste grupo de bactérias apresentarem longo tempo de crescimento em temperaturas de refrigeração, estas bactérias apresentam menor importância quando associadas com outros psicrotróficos, que predominam rapidamente em temperaturas abaixo de 7°C. Assim, quando na presença de alimentos, mesmo após a pasteurização, como por exemplo o leite, se possuírem enzimas lipases e proteinases, estas são capazes de degradar os lipídeos e proteínas do leite, tornando-o impróprio para o consumo. Isso porque podem gerar alteração de sabor e odor do leite, perda

de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e gelatinização do leite longa vida.

Ademais, a presença de um grande número de espécies de microrganismos psicrotróficos pode estar relacionada com ocorrência de toxinfecções alimentares humanas ou com deterioração e perda de qualidade organoléptica dos alimentos. Com relação ao limite de população, a ICMSF estabelece que o limite de microrganismos heterotróficos psicrotróficos em alimentos é de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>.

- **Termófilos**

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos.

Os termófilos são um grupo de microrganismos cuja temperatura ótima é de aproximadamente 60°C, com mínima de 40°C e máxima de até 90°C. Ainda, esses microrganismos pode ser subclassificados em termófilos moderados, quando a faixa de temperatura de multiplicação está entre 20 °C e 55 °C; termófilos extremos, quando seu crescimento se dá em temperaturas de 65 °C a 85 °C; ou ainda hipertermófilos, quando cresce entre 85 °C até 110 °C.

Neste grupo, verifica-se a qualidade microbiológica e sanitária de alimentos processados termicamente. Dentro deste grupo, incluem-se as bactérias dos gêneros *Micrococcus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Alicyclobacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Enterococcus*.

Interessantemente, a manutenção da estrutura do DNA é, sem dúvida, um fator imprescindível para a estabilidade de organismos termófilos, principalmente dos hipertermófilos, ou seja, há substâncias que impedem danos químicos na molécula de DNA, dando maior resistência do DNA à desnaturação térmica.

- **Bolores e leveduras**

Os bolores e leveduras constituem um grande grupo de microrganismos, a maioria originária do solo ou do ar. Além disso, são também bastante resistentes às condições adversas, como pH ácido e atividade de água baixa.



Com relação ao pH, os fungos são muito pouco afetados pela variação na faixa de 3,0 a 8,0. Ainda, a temperatura ótima de crescimento da maioria dos fungos encontra-se na faixa de 25 a 28°C

Bolores são fungos filamentosos, multicelulares, podendo estar presentes no solo, no ar, na água e em matéria-orgânica em decomposição. Eles são extremamente versáteis e capazes de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos. Mesmo que precisem de oxigênio para crescer, alguns bolores usam uma quantidade extremamente baixa do gás, sendo o suficiente para sua disseminação e deterioração do alimento.

Um bolor pode ser prejudicial porque muitas vezes libera micotoxinas, que são substâncias químicas tóxicas produzidas pelos fungos durante seu crescimento, e que podem provocar infecções em indivíduos imunodeprimidos.

Uma das micotoxinas mais conhecidas são as aflatoxinas, toxinas do gênero *Aspergillus*, elas podem ser encontradas em carnes, embutidos, leites e queijos. E, o maior problema das micotoxinas em alimentos para os humanos é que elas possuem uma alta capacidade mutagênica, são danosas ao fígado, diminuem a atividade do sistema imune e causam neoplasia. Além de mutagênicas, também podem ser carcinogênicas.

Já as leveduras são os fungos não filamentosos, normalmente disseminados por insetos vetores, pelo vento e pelas correntes aéreas. Ademais, possuem crescimento regular e redondo e são capazes de se desenvolver em completa ausência de oxigênio.

Assim, a presença de bolores e leveduras viáveis e em índice elevado nos alimentos pode fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem e matéria-prima com contaminação excessiva, principalmente relacionados ao ambiente.

Vale ressaltar que os bolores e as leveduras apresentam exigências nutricionais muito variadas, em comparação às bactérias, mas, geralmente, encontram nos alimentos condições propícias para a sua multiplicação.

Por outro lado, bolores e leveduras podem ser benéficos se utilizados de forma adequada. A maturação e produção de diversos tipos de queijos, por exemplo, é feita por diferentes espécies do gênero *Penicillium*, como *Penicillium roqueforti* para o queijo Roquefort, *P. camemberti* para o

Camembert e Brie, e *P. glaucum* para Gorgonzola e outros tipos de queijos azuis. Assim, um efeito comum dessas fermentações é que estes alimentos se tornam menos atrativos para outras espécies de microrganismos, incluindo os patogênicos e deteriorantes, sendo considerado, deste modo, um método de conservação de alimentos.

- **Coliformes totais e coliformes termotolerantes**

Outro importante grupo indicador são as bactérias do grupo coliforme, os quais apontam contaminação fecal. Os coliformes totais são aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, Gram-negativos, não formadores de esporos que fermentam a lactose, formando ácido e gás após 48 horas de incubação a 35°C. Considerando o critério da fermentação da lactose com formação de gás, representantes de 20 ou mais espécies podem ser classificados nesse grupo, que inclui tanto bactérias do trato gastrointestinal de humanos e animais endotérmicos, que são capazes de sobreviver longos períodos e ainda se multiplicar em ambientes não fecais, como o solo ou mesmo a planta de processamento de um alimento.

Os coliformes termotolerantes, um grupo dentro dos coliformes totais, inicialmente denominados de coliformes fecais, são definidos como aqueles microrganismos capazes de fermentar a lactose, produzindo ácido e gás dentro de 24 a 48 horas a 44,5 – 45,5° C, no caldo *Escherichia coli* (caldo EC). Dependendo da temperatura e do alimento em estudo, cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* podem ser recuperadas do teste de coliformes termotolerantes.

Entre essas, *Escherichia* é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae*. E, diferente da *Salmonella* e da *Shigella*, muitas *Escherichia* são capazes de fermentar a lactose produzindo ácido e gás. O gênero *Escherichia* contém seis espécies: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* e *E. blattae*, sendo a *E. coli* seu principal representante.

*E. coli* é tido como o mais válido indicador de contaminação fecal em alimentos crus e, como já comentado, está presente no trato gastrointestinal dos seres humanos e outros animais, sendo considerada um microrganismo

patogênico oportunista, causando infecção ou intoxicação alimentar em casos particulares. Portanto, este microrganismo avalia a qualidade dos diversos alimentos de origem animal e água e a presença de *Escherichia coli* deve constar no laudo analítico.

Conhecendo, então os microrganismos indicadores, vale ressaltar que a produção de um alimento seguro requer a aplicação de Boas Práticas de Higiene (BPH), Boas Práticas de Agricultura (BPA) e outros programas de pré-requisitos, e também os princípios de HACCP, sempre que aplicáveis. Estas abordagens permitem desenvolver e implementar um sistema completo de gestão de segurança de alimentos, capaz de controlar de forma confiável os perigos significativos no alimento produzido. Alguns perigos são mais bem controlados por meio de Boas Práticas de Higiene ou Boas Práticas de Agricultura (por exemplo, controle dos níveis iniciais de um perigo por meio de higiene adequada), enquanto outros são claramente mais bem controlados por meio de HACCP, no qual um determinado ponto crítico de controle (PCC – *Critical Control Point* – CCP) foi validado para controlar o perigo em questão (por exemplo, redução do nível de perigo ou inibição da multiplicação). Sabe-se que, em muitas situações, medidas preventivas, como as BPH e o HACCP, são ferramentas muito mais eficientes para a gestão da segurança dos alimentos do que a análise do produto final. Consequentemente, a análise microbiológica para determinar a adoção das BPH e para validação e verificação do HACCP é essencial.

## Capítulo 6 - Métodos convencionais de análises microbiológicas de alimentos

Inicialmente, a análise microbiológica de alimentos era utilizada para testar o produto final cuja liberação dependia do resultado dela, ou seja, apenas lotes com resultados negativos eram liberados para a distribuição. Atualmente, analisar amostras de alimentos quanto à presença de bactérias patogênicas, deteriorantes, fungos e toxinas, é uma prática padrão e rotineira para garantir a segurança e a qualidade do alimento.

Além disso, as análises microbiológicas podem ser feitas para rastreamento no caso de uma investigação epidemiológica, com implicações importantes em termos de responsabilidade legal, comércio e identificação da origem potencial do problema.

As análises de alimentos possuem métodos convencionais de cultivo às quais são reconhecidos e aprovados para uso internacional pelas ISO ou FDA, e são procedimentos considerados como o “padrão ouro”, aos quais todos os outros são comparados.

Convencional diz respeito a procedimentos que estão em uso comum, envolvem homogeneização, diluições, inoculação em placas com ágar específicos para a formação de colônias e contagem. Ainda, métodos convencionais são relativamente fáceis de utilizar, porém requerem pessoal do laboratório treinado para preparo de meios de cultura, amostras e interpretação dos resultados. Boas práticas laboratoriais são essenciais para uma análise de qualidade.

Dentre essas práticas, é importante citar que a quantidade da amostra deve ser suficiente (pelo menos 25 g ou mL) e deverá ser sempre homogeneizada (com aparelho *Stomacher*, por exemplo). Além disso, diversas amostras podem ser necessárias de cada lote de alimento, dependendo do critério microbiológico. Ademais, uma etapa de pré-enriquecimento (em meio específico para favorecer a multiplicação de determinado microrganismo e inibir a multiplicação de outros) pode ser necessária para permitir que as células estressadas recuperem suas membranas e rotas metabólicas.

Os métodos convencionais são, com frequência, contagens em placas obtidas por meio de homogeneização da amostra do alimento, diluição e

inoculação em meio específico para detectar o organismo-alvo (já explicado no capítulo 4). Os métodos são muito sensíveis, relativamente econômicos (comparados com os métodos rápidos ou moleculares), mas requerem períodos de incubação de pelo menos 18 a 24 h para a formação de colônias visíveis, sendo que algumas análises podem demorar até 10 dias, como a contagem de microrganismos psicotróficos. Porém, um ponto discutido entre pesquisadores é a questão que muitos patógenos são capazes de entrar em um estado latente, em que as células não são cultiváveis, mas permanecem viáveis, provocado por inúmeros fatores extrínsecos.

Vale ressaltar que a validade do método é definida como a habilidade do teste para realizar o que se pretende. Isso envolve determinar a “sensibilidade” e a “especificidade” do método. A sensibilidade é a capacidade de um método para detectar o maior número de resultados positivos, se a amostra estiver contaminada, enquanto especificidade é a capacidade de não detectar o organismo-alvo na amostra negativa analisada, se o organismo realmente estiver ausente. Para muitos métodos disponíveis para patógenos de origem alimentar, a sensibilidade e a especificidade são da ordem de 95%.

A microbiologia de alimentos convencional requer, então, o uso de caldos e ágar para cultivo dos organismos-alvo. Esses meios devem suprir as necessidades nutricionais e fisiológicas do organismo. Portanto, os meios devem ser desenvolvidos com proteína suficiente, carboidratos, minerais e também com o pH adequado, e serem incubados sob condições favoráveis de temperatura e disponibilidade de oxigênio (ou não, caso forem anaeróbios) por um período de tempo apropriado.

Neste sentido, vale lembrar que para a preparação do meio de cultura, é importante a água usada no preparo de meios e regentes seja purificada (destilada, deionizada ou de qualidade equivalente). Para a homogeneização, se o meio for líquido, agitar o material até a completa dissolução, aquecendo, se necessário. Se o meio for sólido contendo ágar, deixar de molho por alguns minutos e então aquecer em banho fervente, agitando frequentemente até a fusão do ágar. A estocagem deve ser feita em frascos de material inerte, como vidro neutro ou polietileno. E, até o momento do uso, todos os insumos adquiridos para o preparo de meios de cultura devem ser estocados sob condições que garantam sua integridade. A maioria dos produtos traz no rótulo

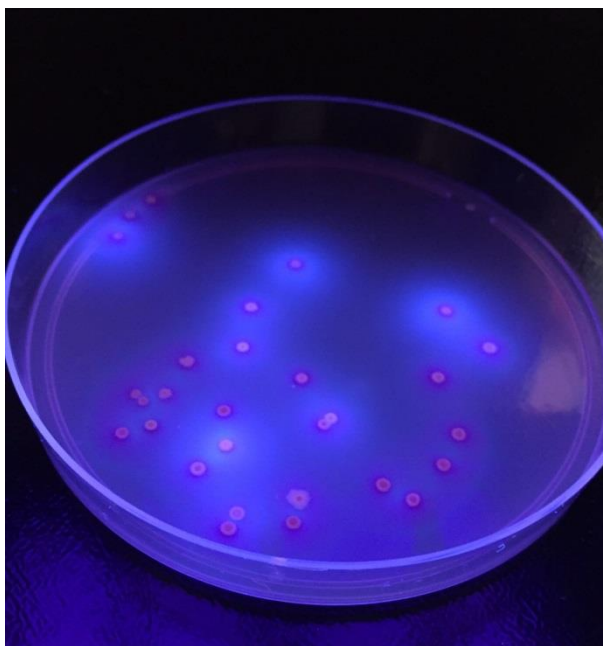
orientações sobre a forma de estocagem, bem como a data de validade. Posteriormente, distribuir o meio em tubos ou frascos apropriados ao uso nos ensaios, garantindo um espaço livre suficiente para que não ocorra transbordamento de material durante a esterilização. Se o ágar for para placas Petri, deve-se esterilizar o meio primeiramente e, após isso, em um fluxo laminar ou próximo à chama de um bico de Bunsen, plaqueia-se o meio de cultura.

Em termos gerais, meios na forma de caldo ou ágar sólido podem ser não seletivos ou capazes de permitir a multiplicação da maioria dos organismos da amostra, seletivos para favorecer a multiplicação do organismo-alvo, ou semisseletivos e diferenciais nos quais o organismo-alvo seja presuntivamente identificado com base na morfologia das colônias, incluindo cor na presença de outros organismos. Esses isolados presuntivos requerem mais testes confirmatórios, os quais são com frequência fenotípicos (perfis bioquímicos). Os meios seletivos devem ser desenvolvidos para inibir a multiplicação dos organismos não alvo, enquanto permitem a multiplicação diferencial simultânea do organismo-alvo. Se a multiplicação desse organismo superar em 100 vezes o organismo não alvo no caldo de cultura, então há uma grande possibilidade de isolamento como cultura pura no plaqueamento. De maneira ideal, os meios seletivos não são inibidores para os organismos-alvo. No entanto, isso nem sempre é obtido, mas de preferência o meio irá recuperar mais de 50% da população inicial.

O ágar sangue, por exemplo, é um meio de cultura não seletivo, isso permite a multiplicação da maioria dos microrganismos, sendo que as colônias não podem ser distintas, necessitando, assim, de outros meios de cultura ou testes bioquímicos para identificação dos microrganismos. Já o ágar MacConkey é semisseletivo, isso porque cresce diferentes microrganismos, os quais podem ser diferenciados pela mudança de cor do meio e/ou da forma ou cor das colônias (*Salmonella* spp., neste meio são incolores, transparentes e tipicamente não alteram a aparência do meio, diferente de *E. coli*, que são colônias cor-de-rosa a vermelhas, podendo estar cercadas por uma zona de precipitação biliar, de dimensão média a grande). E, um exemplo de ágar seletivo é o ágar Listeria Oxford, como o próprio nome diz, seletivo para *Listeria* spp..

Ainda, meios de cultura podem ter substratos fluorogênicos e cromogênicos, os quais podem produzir cor brilhante ou composto fluorescente após o metabolismo da bactéria (Figura 4). Assim, outros substratos podem ser adicionados para facilitar a identificação de um microrganismo.

Figura 4. Ágar MUG, contendo substrato cromogênico, emitindo cor fluorescente com a luz UV, na presença de *Escherichia coli*



Fonte: arquivo pessoal

Compact Dry e o sistema Petrifilm® (3M) são métodos alternativos à semeadura convencional em placas com ágar. O sistema Petrifilm® utiliza uma mistura de nutrientes desidratados e um agente gelificante sobre um filme. A adição de 1 mL da amostra reidrata o gel, o que permite o desenvolvimento das colônias do organismo-alvo. A contagem das colônias é realizada como no método de semeadura em placas convencional. A quantidade da amostra é estimada para ser o dobro da placa de ágar convencional. O sistema Petrifilm está disponível para várias aplicações, incluindo contagem de aeróbios em placa, leveduras, coliformes e *E. coli*.

Deve-se salientar que as análises microbiológicas são baseadas na *American Public Health Association* (APHA), descritas na 5ª edição do

*Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* e das normas ISO 6887-1 (1999) e ISO 7218:2007/*Amendment* 1:2013, recomendadas para ensaios realizados com metodologia da *International Organization for Standardization*.

De modo geral, as contagens em placas são realizadas em grupos de organismos com três propósitos:

- **A contagem aeróbia em placas (APC)**

APC indica a microbiota geral e, portanto, a vida de prateleira do produto. A APC é muito útil na indústria de alimentos porque é fácil de realizar e pode fornecer subsídios para decisões de aceitação ou rejeição de amostras obtidas regularmente, no mesmo ponto, sob as mesmas condições.

A contagem padrão em placas é utilizada tanto para a quantificação de grandes grupos microbianos, como os aeróbios mesófilos, os aeróbios psicotróficos, os bolores e leveduras, os clostrídios sulfito redutores, os enterococos e as bactérias lácticas, como também para gêneros e espécies em particular, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*. O procedimento básico é a inoculação da amostra homogeneizada (e suas diluições) em um meio sólido (com ágar), contido em placas de Petri, seguida da incubação das placas até crescimento visível. A versatilidade da técnica é decorrente do princípio envolvido na contagem, baseado na premissa de que, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, cada célula microbiana presente na amostra irá formar uma colônia isolada. Variando-se o tipo de meio de cultura (meio de enriquecimento, meio seletivo, meio seletivo-diferencial) e as condições de incubação (temperatura e atmosfera), é possível selecionar o grupo, gênero ou espécie que se deseja contar. Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos (pares, tétrades, cachos, cadeias etc.), não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. Essa correlação é feita entre o número de colônias e o número de “Unidades Formadoras de Colônias” (UFC), que podem ser tanto células individuais como agrupamentos característicos de certos microrganismos.

Para a inoculação no meio de cultura, chamada de plaqueamento, podem ser utilizados quatro procedimentos básicos: a) o plaqueamento em profundidade (pour plate), b) o plaqueamento em superfície (spread plate), c) o



plaqueamento em gotas (drop plate) ou d) a filtração em membrana, os quais serão descritos a seguir.

a. Plaqueamento em profundidade (pour plate)

Esta técnica é usada para contagem total de aeróbios mesófilos, contagem de clostrídios sulfito redutores, contagem de enterobactérias, contagem de enterococos e contagem de bactérias lácticas.

Procedimento: Fundir os meios de cultura em banho com água fervente, mantendo a fervura apenas o tempo necessário para a fusão do ágar. Resfriar imediatamente em água fria e manter à temperatura de 44 a 46°C (em banho maria ou estufa), até o momento do uso. Em um fluxo laminar ou próximo à chama de um bico de Bunsen, inocular 1 ml de cada diluição das amostras em placas Petri separadas, estéreis e vazias (começar pela amostra mais diluída, para poder usar a mesma pipeta; caso contrário, deve-se utilizar uma pipeta a cada diluição). Após isso, retirar o meio de cultura do banho ou estufa e, se o frasco estiver molhado, secar com papel toalha, para evitar respingos nas placas, no momento do plaqueamento. Além disso, não se deve agitar o meio, para não formar bolhas. Posteriormente, verter 15 a 17 ml do meio nas placas inoculadas e, então, misturar o meio com o inóculo, movimentando suavemente as placas, numa superfície plana, em movimentos na forma de oito ou em movimentos circulares, oito a dez vezes no sentido horário e oito a dez vezes no sentido anti-horário, cuidadosamente. Aguardar a completa solidificação do meio de cultura, inverter as placas (exceto quando houver recomendação em contrário nos capítulos específicos) e incubar nas condições de temperatura, tempo e atmosfera especificadas para cada ensaio.

b. Plaqueamento em superfície (spread plate)

Este procedimento é usado para contagem total de aeróbios psicotróficos, contagem de bolores e leveduras, contagem de *S. aureus* e contagem de *B. cereus*. Nesta técnica, diferente da anterior, é que a amostra e/ou suas diluições são inoculadas diretamente na superfície do meio sólido, já distribuído em placas, ou seja, o meio de cultura já deve estar vertido nas placas e solidificado (de preferência no dia anterior ao uso).

Procedimento: Em um fluxo laminar ou próximo à chama de um bico de Bunsen, inocular 0,1 ml de cada diluição das amostras em placas Petri

contendo o meio de cultura já estéril e solidificado. Posteriormente, espalhar o inóculo por toda a superfície do meio, com uma alça de Drigalski, até que o excesso de líquido seja absorvido. Após isso, inverter as placas (exceto quando houver recomendação em contrário nos capítulos específicos) e incubar nas condições de temperatura, tempo e atmosfera especificadas para cada ensaio.

c. Plaqueamento em gotas (drop plate)

O plaqueamento em gotas é uma técnica de inoculação em superfície, como a de plaqueamento em superfície. A principal diferença é que o inóculo não é espalhado, mas sim, depositado no meio de cultura, em gotas de 0,01 ml. Como as gotas ocupam um espaço mínimo, é possível inocular, numa mesma placa, três diluições em triplicata, três gotas por diluição. Isso torna a técnica extremamente econômica, com limite de detecção de 1.000 UFC/g de produtos sólidos ou 100 UFC/ ml de produtos líquido. Apesar disso, não é uma técnica rotineiramente utilizada na análise de alimentos, mas pode ser muito útil em situações que exijam a inoculação de um número grande de diluições.

d. Filtração em membrana

O procedimento de filtração em membrana é usado apenas em análises de amostras líquidas límpidas, sem sólidos em suspensão, que possam ser filtradas através de uma membrana de poro 0,45µm. Sua principal vantagem é que permite a inoculação de maiores volumes da amostra, concentrando na membrana os microrganismos presentes na quantidade inoculada.

Seu principal uso é na contagem total de aeróbios mesófilos, contagem de bolores e leveduras, contagem de bactérias lácticas, contagem de enterococos e contagem de coliformes totais/fecais/*E. coli* em água, outros produtos líquidos ou produtos sólidos que possam ser transformados numa solução límpida, como sal e açúcar, por exemplo.

O conjunto de filtração é composto de um porta filtro, um kitasato e um copo de filtração. O porta filtro é um tipo de funil cuja parte superior é plana, para acomodar o filtro membrana e, sobre essa, o copo de filtração, preso por uma presilha. A parte inferior do porta filtro é acoplada ao kitasato que, conectado à uma bomba de vácuo, recolhe o líquido filtrado. Vale lembrar que

todas as partes devem ser esterilizadas em autoclave, antes do uso, separadamente, incluindo a membrana filtrante que será usada.

Procedimento: Montar o kit de filtração em um fluxo laminar ou próximo à chama de um bico de Bunsen. Colocar o líquido e ligar a bomba de vácuo para proceder à filtração. Após a passagem da amostra, ainda com a bomba ligada, enxaguar as paredes do copo com 20 a 30 ml com um diluente, para recolher eventuais contaminantes aderidos. Repetir esse procedimento mais uma vez. Desligar a bomba de vácuo antes que a membrana seque excessivamente. Quando o volume a ser filtrado for menor do que 20 ml, adicionar ao copo do conjunto de filtração cerca de 20-30 ml de diluente, antes da adição da amostra. Não é necessária uma medida exata do volume de diluente, cuja função é aumentar o volume a ser filtrado, facilitando uma melhor distribuição dos microrganismos na membrana. Retirar o copo e, com uma pinça flambada e resfriada, transferir a membrana para a placa com o meio de cultura, com a face quadriculada para cima. Ao colocar a membrana no meio de cultura é importante que toda a superfície fique completamente aderida ao meio, para que haja contato dos microrganismos com os nutrientes.

- **Técnicas básicas de contagem de microrganismos pelo número mais provável (NMP)**

A técnica do número mais provável é um método de análise quantitativo que permite determinar o número mais provável (NMP) do(s) microrganismo(s) alvo na amostra, através da inoculação de alíquotas dessa amostra em uma série de tubos, contendo um meio de cultura líquido adequado ao seu crescimento. A determinação do número de microrganismos é baseada no princípio de que, subdividindo a amostra em alíquotas, algumas alíquotas vão conter microrganismos e outras não, dependendo da quantidade dos microrganismos na amostra.

É uma técnica bastante versátil, permitindo a enumeração de diferentes grupos ou espécies de microrganismos, variando-se o meio de cultura e as condições de incubação. Suas principais aplicações são a contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* em água e alimentos. Pode também ser utilizada em outros ensaios quantitativos, quando a contaminação esperada na amostra está abaixo do limite de detecção do

plaqueamento ou quando partículas do alimento interferem na contagem em placas.

Procedimento: Inocular três alíquotas de cada diluição em tubos do caldo de cultura, selecionando o caldo de acordo com o ensaio a ser realizado. Em alguns ensaios recomenda-se utilizar uma série de cinco alíquotas por diluição, porém, o mais comum é que cada diluição seja feita em triplicata. Utilizar uma pipeta diferente para cada diluição ou começar da amostra mais diluída para, então, poder usar a mesma pipeta. Incubar os tubos nas condições especificadas para o ensaio. Para a leitura do resultado, dependendo da metodologia usada, verifica-se o crescimento, através da turvação do meio de cultura, desde que não provocada pela própria amostra; ou verifica-se a produção de gás, através da formação de bolhas em tubos invertidos (tubos de Durham), colocados nos tubos de caldo antes da esterilização; ou ainda verifica-se a produção de ácido ou base através da viragem de um indicador de pH adicionado ao caldo de cultura, o qual mudará a cor do meio. Para a contagem final, utiliza-se a tabela de Hoskins.

- **Técnicas básicas de detecção da presença/ausência de microrganismos**

Vários ensaios utilizados na análise de alimentos são qualitativos (presença/ausência), incluindo os de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*. Todos utilizam as mesmas técnicas microbiológicas básicas, que são o enriquecimento em um ou mais caldos específicos e o posterior isolamento em meios sólidos. A principal razão para que esses ensaios sejam qualitativos é a etapa de enriquecimento, que dificulta a quantificação, embora seja possível.

Após o isolamento da amostra em meio de cultura sólido, realiza-se a etapa de confirmação, para que seja confirmada a identidade da cultura isolada, através de testes que verificam características fenotípicas típicas do(s) microrganismo(s) alvo. As características mais usadas na confirmação são as morfológicas, as bioquímicas e as sorológicas. As características morfológicas incluem principalmente a forma das células (cocos, bastonetes retos, bastonetes curvos, helicoidais), o arranjo das células (isoladas, em pares, em

tétrades, em cadeias, em cachos, em filamentos) através da coloração de Gram, a motilidade e a formação de esporos. As características sorológicas incluem principalmente a verificação da presença dos antígenos somáticos “O” da parede celular e dos antígenos flagelares “H”. Além disso, realiza-se testes bioquímicos, os quais dependem do microrganismo.

Sabendo disso, o principal desafio para as indústrias é a identificação dos critérios relevantes para garantir a segurança e a qualidade microbiológica de alimentos, e sua especificação de acordo com as estratégias de gestão de segurança de alimentos baseada em risco, gerando limites microbiológicos de cada alimento.

Por exemplo, a gestão de risco eficaz de um sistema de produção de carne pode incluir a validação de práticas utilizadas no campo, visando a garantia da saúde animal e a redução do nível de infecção do rebanho (zoonoses); práticas de abate direcionadas à minimização da contaminação; procedimentos de resfriamento e controle de temperatura, direcionados à minimização do potencial de multiplicação de patógenos; instruções para os consumidores, visando a garantia de que o produto será aquecido até a temperatura mínima necessária para a inativação de patógenos.

## Capítulo 7 - Métodos moleculares de análises de alimentos

As técnicas tradicionais de microbiologia de alimentos fundamentam-se, como já comentado, na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. As técnicas microbiológicas mais comumente utilizadas são realizadas em meios de cultura não-seletivos e seletivos complementadas por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria, de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos.

Os métodos tradicionais de detecção de microrganismos em alimentos, embora confiáveis e eficientes, requerem, muitas vezes, de vários dias a semanas antes dos resultados serem obtidos. Além disso, as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e quando são, podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas, além da possibilidade de existência de células viáveis, porém não-cultiváveis.

Assim, a inovação em métodos microbiológicos qualitativos é requerida a fim de reduzir ou eliminar os inconvenientes dos métodos convencionais. Ressalta-se que o principal objetivo do emprego de tecnologias (conhecimento, método, procedimento, equipamentos, etc.) é a busca de novas soluções técnicas em processos ou produtos.

Desse modo, métodos rápidos alternativos estão sendo desenvolvidos e empregados como potenciais substitutos aos métodos clássicos ou como complementares a estes e, entre os métodos alternativos destacam-se os métodos fundamentados em técnicas de biologia molecular.

As técnicas moleculares constituem-se hoje em ferramentas de alto valor para identificação de patógenos em alimentos, sejam quaisquer forem suas origens. Além disso, encurtam o tempo entre a coleta da amostra de alimento e a obtenção do resultado. Assim, este capítulo irá mostrar alguns testes moleculares utilizados em microbiologia de alimentos, com exemplos de uso. A aplicação de técnicas mais eficazes permite que erros na identificação e conseqüentemente no tratamento do paciente e erradicação do patógeno sejam cada vez menos frequentes, melhorando a saúde tanto dos animais de produção como da população, ambos acometidos por infecções alimentares.

- **Técnicas moleculares fundamentadas na extração e corte de ácidos nucléicos**

As primeiras técnicas moleculares, utilizadas há mais de duas décadas, são fundamentadas na extração e tratamento de ácidos nucléicos, dentre estas se podem destacar a extração de DNA por fervura ou utilização de kits, análise do perfil plasmidial, a análise de DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição (Restriction endonuclease analysis - REA) e a eletroforese em gel de campo pulsante (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE).

A extração e a purificação de ácidos nucléicos a partir de diversas amostras experimentais (bactérias, fungos, tecidos vegetais e tecidos animais) é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR), por exemplo. Esta etapa é necessária pq o DNA, em sua forma original de dupla fita, apresenta alta estabilidade e é muito resistente e se mantém inalterado em várias condições de meio. A extração de DNA inclui basicamente dois procedimentos principais: a lise das células presentes na amostra e a purificação do DNA. Após a lise das células, o DNA deve ser separado dos restos celulares e das proteínas, precipitado e suspenso em volume adequado de água ultrapura ou soluções-tampão adequadas. As amostras de DNA podem também ser submetidas a processos de concentração e de purificação, com a finalidade de se obter melhores resultados nas amplificações. Para cada tipo de amostra, vários protocolos podem ser testados, adaptados e otimizados, de maneira a se conseguir DNA de boa qualidade.

Já o perfil plasmidial foi a primeira técnica de biologia molecular aplicada à tipagem de cepas bacterianas. Os plasmídeos são DNA's extracromossomais circulares que podem ser sintetizados ou excluídos dependendo da sua necessidade dentro da célula microbiana. Os passos básicos da técnica são a extração seletiva do DNA plasmidial da célula microbiana, a digestão do plasmídeo com enzimas de restrição (enzimas que cortam DNA) e uma "corrida" em um gel suporte submetido a um campo elétrico gerado por uma fonte de tensão, denominada de eletroforese, em que, por meio do número e do tamanho de fragmentos plasmidiais obtidos, ocorre a separação no gel, formando perfis que serão visualizados por meio de ultra-radiografia ou sob luz ultravioleta, sendo estes utilizados como marcadores para um gênero, espécie

ou subespécie. Esta técnica origina boas informações epidemiológicas, mas como os plasmídeos são elementos extracromossômicos, podem ser espontaneamente perdidos ou ganhos por uma linha hospedeira, assim, são usados, por exemplo, para verificar a ocorrência de surto e sua origem.

A análise de DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição (restriction endonuclease analysis - REA) possui os passos básicos semelhantes aos da análise do perfil plasmidial: extração de DNA, corte com enzimas e eletroforese. Porém, utilizam-se endonucleases de restrição, aos quais clivam o DNA tanto em regiões encontradas frequentemente, como naquelas infrequentes. Esta pode ser usada para caracterizar espécies e também permite a diferenciação em cepas. Esta diferenciação é possível graças a pequenas alterações na sequência de nucleotídeos do cromossomo que origina sítios de clivagem diferentes. Esta técnica, porém, gera centenas de bandas que podem estar sobrepostas ou podem não ser bem resolvidas, gerando dificuldade de interpretação visual dos perfis originados.

Uma outra técnica empregada para diferenciação entre indivíduos de uma mesma espécie, mas de cepas diferentes, é o chamado polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP). Esta técnica implica em uma digestão com endonucleases de restrição, seguida de eletroforese em gel de agarose e uma posterior transferência tipo *southern* para uma membrana onde é feita uma hibridização com uma sonda marcada. Esta sonda pode ser a sequência do gene de frações 16S ou 23S do RNA ribossômico ou outra sequência genética conhecida. A técnica de RFLP tem uma vantagem sobre a REA por demonstrar menos bandas a serem analisadas e comparadas.

Ainda, existe a técnica de eletroforese de campo pulsante (PFGE do inglês, "*pulsed field gel electrophoresis*"), a qual faz uso de endonucleases de restrição que reconhecem poucos sítios no cromossomo, resultando em fragmentos grandes. Assim, essa técnica é capaz de traçar a disseminação de um microrganismo em uma linha de produção, por exemplo.

- **Técnicas moleculares fundamentadas na reação em cadeia da polimerase – PCR**

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, são obtidas milhões de



cópias de sequências de ácidos nucleicos, por meio de uma reação enzimática, partir de diminutas quantidades de sequências de DNA ou de RNA específicas, por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (primers) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA. Esta pode de tipificar e discriminar, com maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade e especificidade, diferentes tipos de bactérias. Ainda, com a PCR multiplex, é possível amplificar, de modo simultâneo, sequências alvo de diferentes microrganismos patogênicos em uma única reação.

Várias modificações da técnica de PCR básica foram descritas, como a ensaio de DNA polimórfico randomicamente amplificado (RAPD). Esta, possui, como principal vantagem sobre o PCR tradicional, a possibilidade de detectar polimorfismos do DNA sem a necessidade de conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos de um gene relevante ou do DNA alvo. Assim, o RAPD se baseia no uso de pequenos primers de 9 a 10 bases, que hibridizam com suficiente afinidade as sequências de DNA cromossômico a baixas temperaturas de pareamento, de tal forma que podem ser usados para iniciar amplificação de regiões do genoma bacteriano. O número e a localização dos sítios de hibridização aos primers variam dentro de cepas de uma mesma espécie. É feita, em seguida, uma separação através de eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação, e os padrões de banda devem, teoricamente, ser diferentes entre as cepas relacionadas.

Uma limitação da reação PCR tradicional está na característica qualitativa desta técnica, limitando-a para estudos quantitativos. Em função disso, desenvolveu-se uma nova metodologia denominada de PCR em tempo real (*Real Time PCR*). Esta metodologia utiliza processos químicos automatizados de monitoramento do acúmulo de produtos de PCR em uma reação, em tempo real, ou seja, possibilita o monitoramento da síntese de produtos de amplificação no decorrer da própria reação de síntese PCR e não apenas no final da reação como ocorre na PCR tradicional). Esta técnica possui sistema tubular para detectar o acúmulo de produtos de PCR, composto

de um termociclador com câmeras detectoras refrigeradas para detecção de luz fluorescente, em que a ressonância emitida é diretamente proporcional à intensidade de fluorescência e por sua vez ao número de amplicons produzidos, gerando uma curva-padrão, associando a ressonância emitida com os produtos amplificados. Possui ainda sistema informatizado com software que realiza a separação, quantificação e interpretação do espectro gerado, realizando assim a distinção e quantificação de mais de um fluoróforo, que por sua vez permite a detecção de mais de um DNA alvo.

Ainda, existe a RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*), desenvolvida para amplificar DNA obtido por meio da transcrição reversa de RNA. Para isto, primeiramente, o RNA é convertido em DNA complementar (DNAC) pela ação da enzima transcriptase reversa (RT) e o DNAC é amplificado por PCR. Esta técnica pode ser utilizada na análise de expressão de genes (de virulência e/ou produção de toxinas) em alimentos.

Nas últimas décadas, verificou-se aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas, com o objetivo de melhorar a eficiência dos laboratórios, simplificando trabalhos, reduzindo o custo no geral, aumentando a capacidade analítica, além de aumentar a confiabilidade e precisão dos resultados. Desse modo, diferentes técnicas estão sendo desenvolvidas e empregadas como potenciais substitutos aos métodos clássicos.

Entretanto, para que ocorra essa inovação em métodos analíticos é necessário que a legislação brasileira vigente se amplie, pois está focada em métodos que são trabalhosos, demorados e que podem oferecer dificuldades de detecção, facilitando, assim, a exportação de produtos de origem animal brasileiros e de qualidade.

## **Capítulo 8 - Principais análises e medidas de controle recomendadas para a avaliação da qualidade de alimentos**

A análise de alimentos fornece informações sobre uma variedade de características que compreendem os alimentos, como composição, valores nutricionais, propriedades físico-químicas e, principalmente, segurança. A preocupação com a qualidade e segurança dos alimentos envolvem não apenas o consumidor, mas fabricantes, fornecedores, laboratórios de serviços analíticos e de pesquisa, além do governo, uma vez que está em jogo a saúde pública.

Bactérias, leveduras, fungos e alguns protozoários são os microrganismos mais encontrados em alimentos, especialmente as bactérias. Alguns desses microrganismos causam deterioração, ao passo que outros são capazes de causar doenças.

Lidar com problemas de segurança de alimentos é desafiador, em parte porque eles estão mudando. Temos mudanças na economia, estilos de vida, hábitos alimentares (tipos de alimentos, se comemos em casa ou não) e expectativa de vida da população. Os agentes causadores das doenças de origem alimentar também mudam, permitindo a ocorrência de patógenos emergentes, antes desconhecidos.

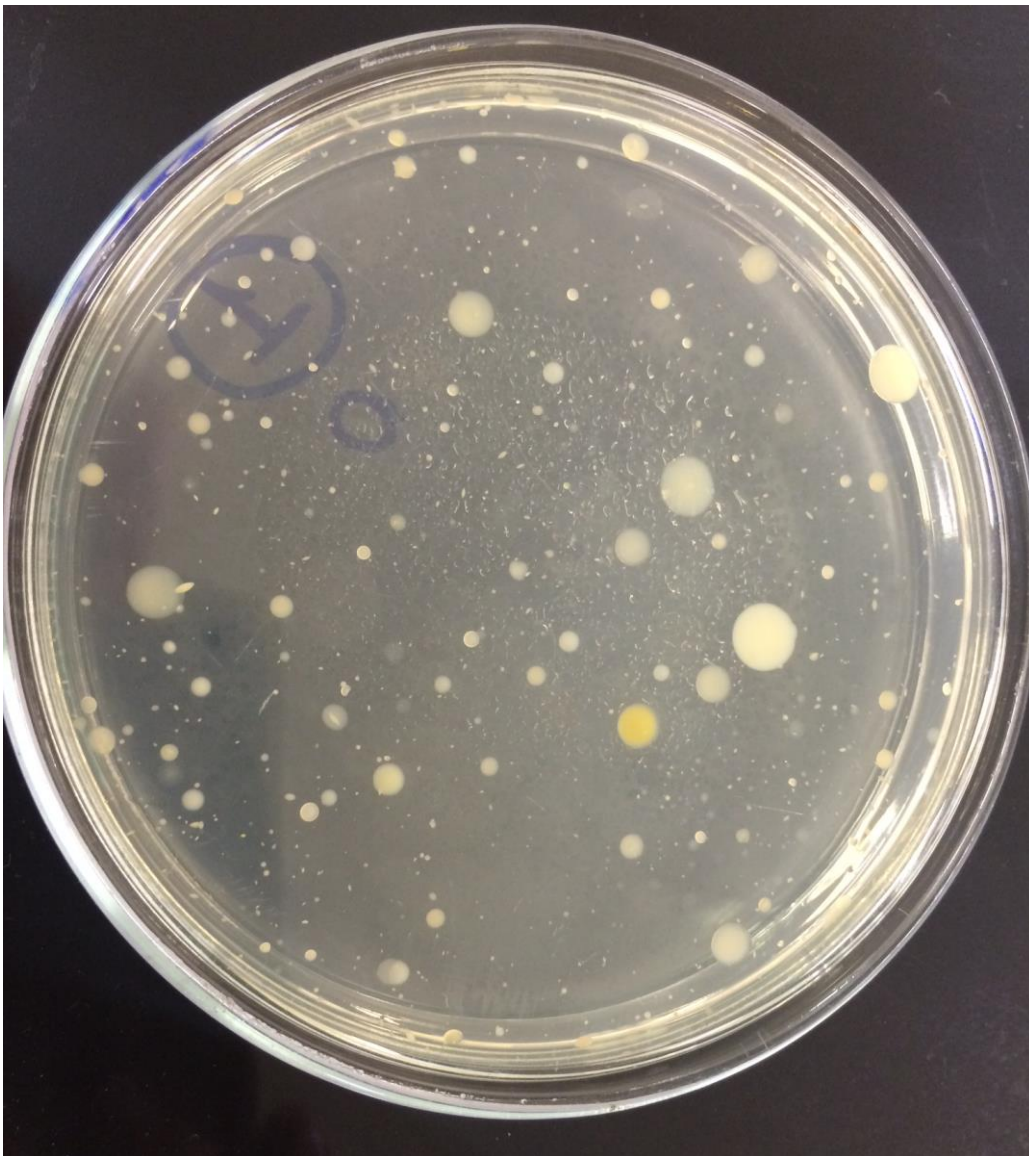
Um dos grandes objetivos da análise de alimentos é garantir que produtos seguros, nutritivos e desejáveis cheguem até a mesa dos consumidores. Abaixo, algumas análises de rotina, importantes para alimentos de origem animal.

- **Contagem padrão em placas de microrganismos heterotróficos aeróbios ou facultativos, mesófilos e psicotróficos viáveis (APHA, 2001)**

Deposita-se uma alíquota de 1 mL de cada diluição no fundo de placas de Petri esterilizadas, em quadruplicata. A seguir, adiciona-se 15 mL a 17 mL de ágar padrão para contagem (PCA) fundido e resfriado a temperatura em torno de 45 °C.

Após a homogeneização e solidificação do ágar a temperatura ambiente, duas placas (ideal sempre fazer em duplicata) devem ser incubadas a 35 °C por 48 horas para a quantificação de mesófilos (Figura 5), e as outras duas placas, incubadas a 7 °C por 10 dias para quantificação de psicrotóxicos. As contagens são realizadas no contador de colônia segundo a técnica padrão, dando preferência as placas com 25 a 250 colônias.

Figura 5. Placa com multiplicação de microrganismos mesófilos



Fonte: Arquivo pessoal

- **Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais/grama (APHA, 2001)**

Teste presuntivo: utiliza-se três séries de tubos de caldo lauril sulfato triptose, com tubo de Durhan invertido. Neles, é inoculado 1 mL em cada tubo, a partir das diluições de  $10^1$  a  $10^{-7}$ . Após, devem ser incubados a 35 °C por 24 a 48 horas. as culturas que produzirem gás são consideradas positivas.

Teste confirmativo: de cada tubo com resultado positivo no teste presuntivo é transferida uma alçada da cultura (alça de níquel-cromo de 3 mm de diâmetro) para tubos correspondentes contendo caldo lactose-verde brilhante-bile a 2% e tubo de Durhan invertido. Após o processo, realiza-se a incubação a 35 °C por 24 a 48 horas e são considerados positivos os desenvolvimentos bacterianos que produziram gás neste período.

De acordo com o número de tubos positivos e, empregando a tabela de Hoskins, é determinado o NMP de coliformes totais por grama.

- **Determinação do NMP de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* (APHA, 2001)**

Coliformes termotolerantes: a partir de cada tubo de caldo lauril sulfato triptose com resultado positivo no teste presuntivo para coliformes totais, são inoculados com alça, tubos correspondentes contendo caldo EC e tubo de Durhan invertido. A incubação é realizada em banho-maria a  $44,5 \pm 0,2$  °C por  $24 \pm 2$  horas e são considerados positivos os tubos com multiplicação bacteriana e produção de gás (Figura 6). De acordo com o número de tubos positivos e, empregando a tabela de Hoskins, é determinado o NMP de coliformes termotolerantes por grama.

Figura 6. tubos com multiplicação bacteriana e produção de gás, confirmando a presença de microrganismos termotolerantes

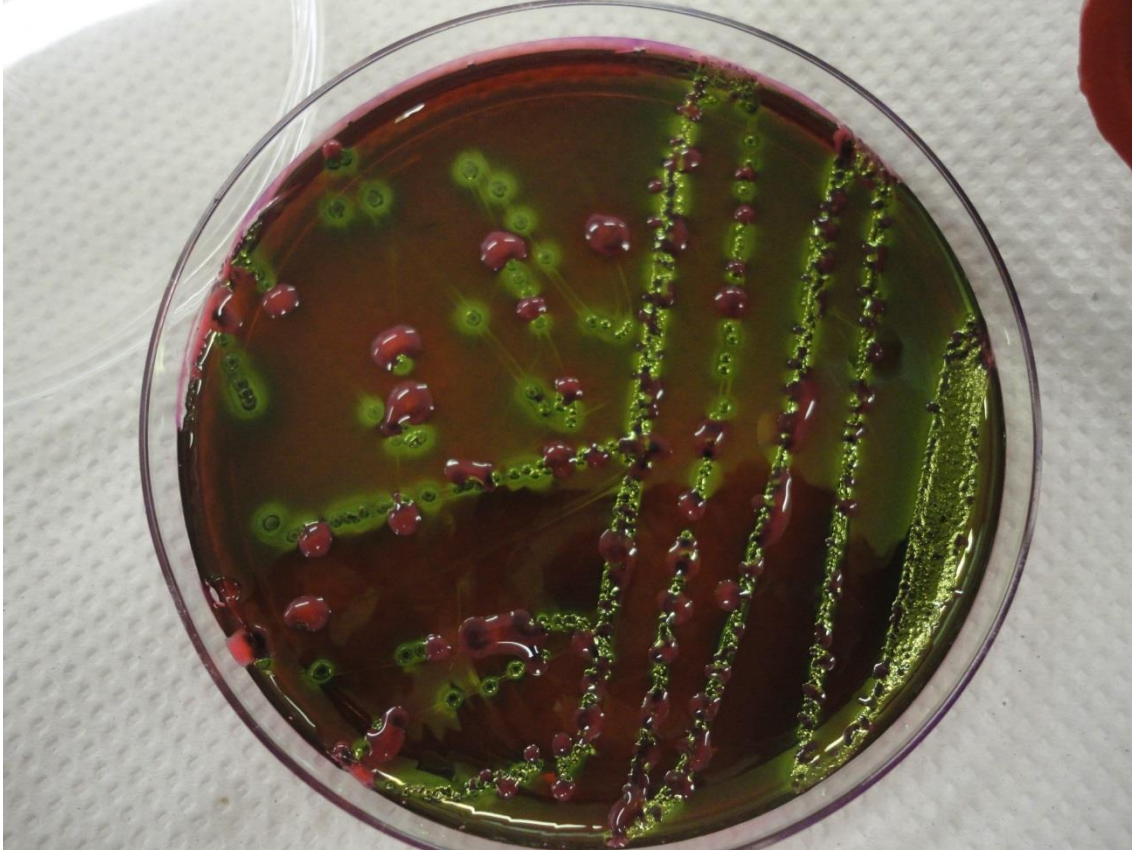


Fonte: Arquivo pessoal

*Escherichia coli*: a partir dos tubos com resultados positivos para coliformes termotolerantes em caldo EC, são semeadas placas de ágar eosina-azul de metileno (EMB) e em seguida são encubadas a 35°C por 24 horas. Após o período e havendo desenvolvimento de colônias, são transferidas de cada placa, três colônias características (cor negra, chata, seca e com brilho metálico, visualizadas na figura 7), para ágar nutriente inclinado. Após incubação a 35°C por 24 horas, realiza-se coloração de Gram em cada tubo, para a verificação da morfologia dos isolados. Constatada a presença de bacilos Gram-negativos, em cultura pura, esses são semeados em meios para confirmação bioquímica através das provas do IMViC ou seja: produção de

indol (I), Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e do aproveitamento de citrato (C), usando metodologias descritas em Mac Faddin (1976).

Figura 7. Placa de EMB contendo colônias sugestivas de *Escherichia coli*



Fonte: Arquivo pessoal

As culturas que se apresentavam em forma de bacilos Gram negativos e, que ao teste do IMViC apresentaram resultados ++ -- ou - + --, são consideradas como de *E. coli*.

O NMP de *E. coli* foi obtido considerando-se as porções positivas para esta bactéria e empregando-se a Tabela de Hoskins.

- **Contagem de *Staphylococcus coagulase positivo* e pesquisa de *Staphylococcus aureus* (APHA, 2001)**

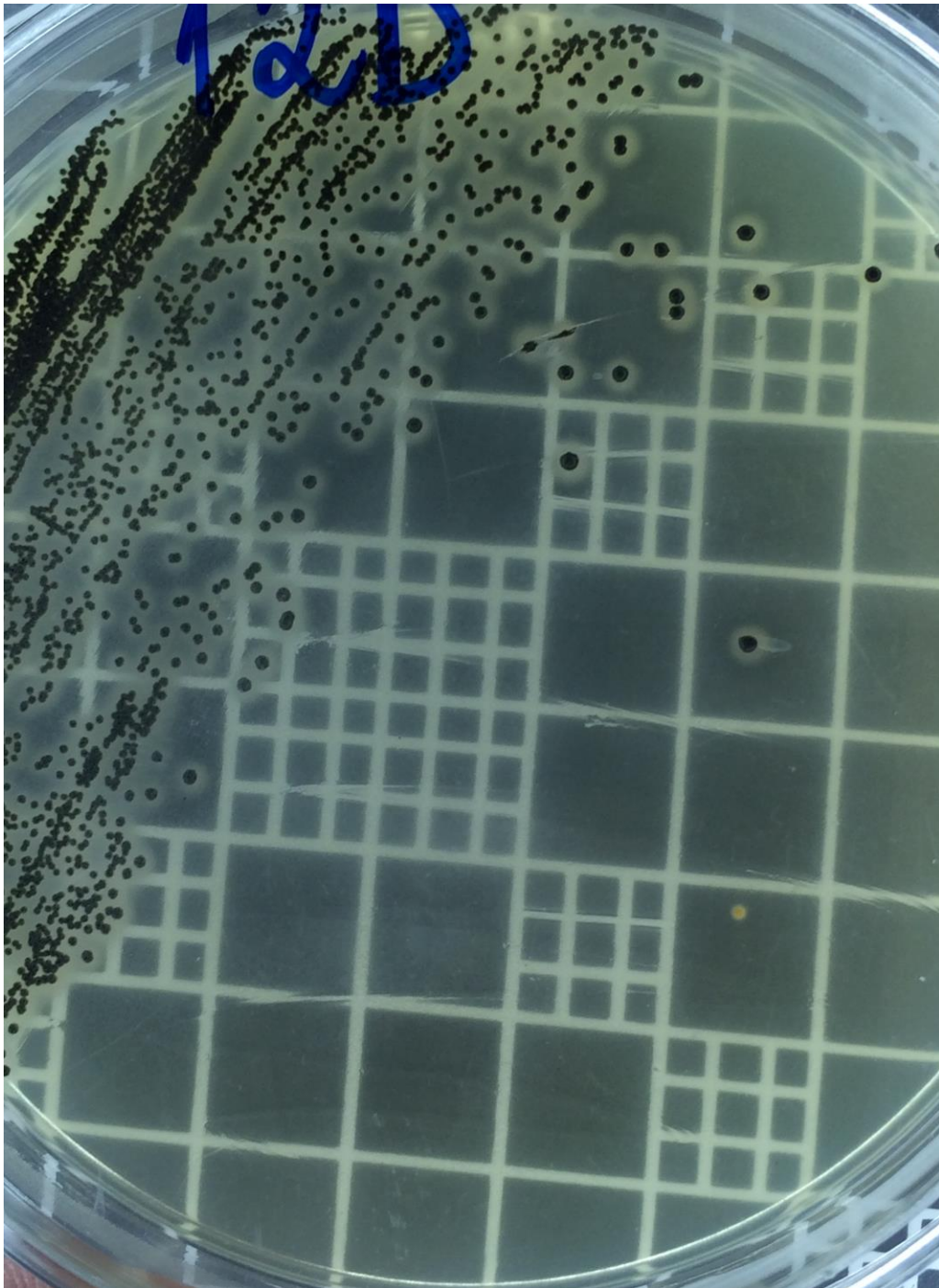
Das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  são retirados 0,1 mL e depositados em placas de Petri contendo Ágar de Baird-Parker. A seguir, com um auxílio de um bastão de vidro em forma de “L” esterilizado, é realizada a distribuição do

inóculo por toda a superfície do meio e as placas são incubadas a 35 °C por 24 a 48 horas.

Após a incubação, são contadas as colônias presentes nas placas entre 20 e 200 colônias, separadamente. São consideradas para a contagem as colônias negras e brilhantes, com ou sem zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro (Figura 8).

Figura 8. Placas de Baird-Parker contendo colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp..





Fonte: Arquivo pessoal

A seguir, 3 a 5 colônias, com as características consideradas, são semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas. Após incubação, esfregaços são preparados e corados pelo método de Gram e as culturas que se apresentam na forma de cocos Gram-positivos, formando massas irregulares em forma de cachos de uva, são submetidas às

provas da catalase e oxidação e fermentação da glicose (O/F), para confirmação do gênero.

Cepas com resultados positivos nas provas confirmativas do gênero *Staphylococcus* são submetidas à prova da coagulase livre.

Dentre as cepas coagulase positivas, é confirmada a presença de *Staphylococcus aureus* através das provas de fermentação do manitol em anaerobiose e da produção de acetoina (VP) (MAC FADDIN, 1976).

- **Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* (APHA, 2001)**

Pré-enriquecimento: de cada amostra é retirado, assepticamente, 25 gramas e adicionados a 225 mL de água peptonada a 1%. Após homogeneização em aparelho *Stomacher*, a mistura é incubada a 37 °C por 24 horas.

Enriquecimento seletivo: duas alíquotas, uma de 1 mL e outra de 0,1 mL da cultura de pré-enriquecimento, são inoculadas respectivamente, em 10 mL de caldo selenito cistina e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, adicionados de 0,1 mL de solução de novobiocina a 0,4%, dando uma concentração de 40 microgramas do principio ativo por mililitro do meio. Em seguida, os caldos seletivos são incubados a 37 °C por 24 horas.

Plaqueamento seletivo: com auxílio de uma alça de níquel-cromo, cada cultura em caldo de enriquecimento é semeada pela técnica de esgotamento em ágar verde-brilhante e ágar MacConkey, seguido de incubação a 37 °C por 24 horas.

Identificação presuntiva: 3 a 5 colônias, com características sugestivas do gênero *Salmonella*, obtidas no plaqueamento seletivo são retiradas com auxílio de agulha de níquel-cromo previamente flambada e inoculadas em tubos contendo ágar triplice açúcar ferro (TSI) e meio para a realização da prova da descarboxilação da lisina (LIA).

Confirmação sorológica: para tal, cultivos que, na identificação presuntiva apresentam reações condizentes com o gênero, são transferidos com alça de níquel-cromo para lâminas de vidro contendo gotas de solução fisiológica. Após homogeneização da colônia com a solução fisiológica na lâmina, é acrescentada uma gota de soro anti-salmonela polivalente somático-

O, seguido de movimentação da lâmina para leitura. Se ocorrer a aglutinação na mistura, a prova é considerada positiva. O mesmo procedimento é realizado para o soro polivalente flagelar-H. Assim, é considerada como gênero *Salmonella* o cultivo que apresentasse positividade em ambas as provas.

- **Isolamento do *Vibrio parahaemolyticus* (APHA, 2001)**

Inicialmente 25 gramas de cada uma das amostras são adicionadas a soluções contendo 225 mL de salina fosfatada tamponada (PBS) esterilizada. Após incubação a  $35 \pm 2$  °C por 18 a 24 horas, o material pré-enriquecido é semeado pelo método de esgotamento em placas de Petri contendo ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS). Após isto, as placas são incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 18 a 24 horas.

Na etapa seguinte, 3 a 5 colônias típicas de cada amostra, ou seja, opacas, verde-azuladas com 2 a 3 mm de diâmetro, são inoculadas em ágar arginina glicose inclinado (AGS) e incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, as amostras presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus* apresentam desenvolvimento com acidificação na base (arginina desidrolase negativa) e alcalinização no bisel, sem produção de H<sub>2</sub>S e de gás. São, então, inoculados também, por picada profunda, tubos com meio semi-sólido para teste de motilidade.

As culturas móveis, Gram negativas, que produzem ácido na base e são alcalinas no bisel em ágar AGS, e não formam gás, são submetidas às provas da oxidase, hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina, crescimento em caldo nutriente com 0% a 10% de cloreto de sódio, crescimento a 42 °C, fermentação da sacarose, da D-celobiose, da lactose, da arabinose, da D-manose e do D-manitol, ONPG, Voges-Proskauer (VP), sensibilidade a 10µg e 150µg do agente vibriostático O/129, gelatinase e urease para a confirmação da espécie. Estas provas são realizadas através da metodologia descrita em Mac Faddin (1976).

A diferenciação do *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus* se dá através do desenvolvimento exclusivo até a 8% de cloreto de sódio, pela fermentação variável da D-celobiose, fermentação da arabinose, pela resistência no teste de

sensibilidade a 10µg do agente vibriostático O/129 e variabilidade na produção de urease.

Todas as cepas identificadas bioquimicamente como *Vibrio parahaemolyticus* são submetidas ao teste de Kanagawa. Para isto, o microrganismo suspeito é inoculado em caldo soja tripticase (TSB) com 3% de cloreto de sódio e incubado a 35 ±2 °C por 18 a 24 horas. Após esse período, são inoculadas várias gotas, com ajuda de alça de níquel-cromo, em placas contendo ágar Wagatsuma. Após a incubação a 35 ±2 °C por 18 a 24 horas, são realizadas as leituras.

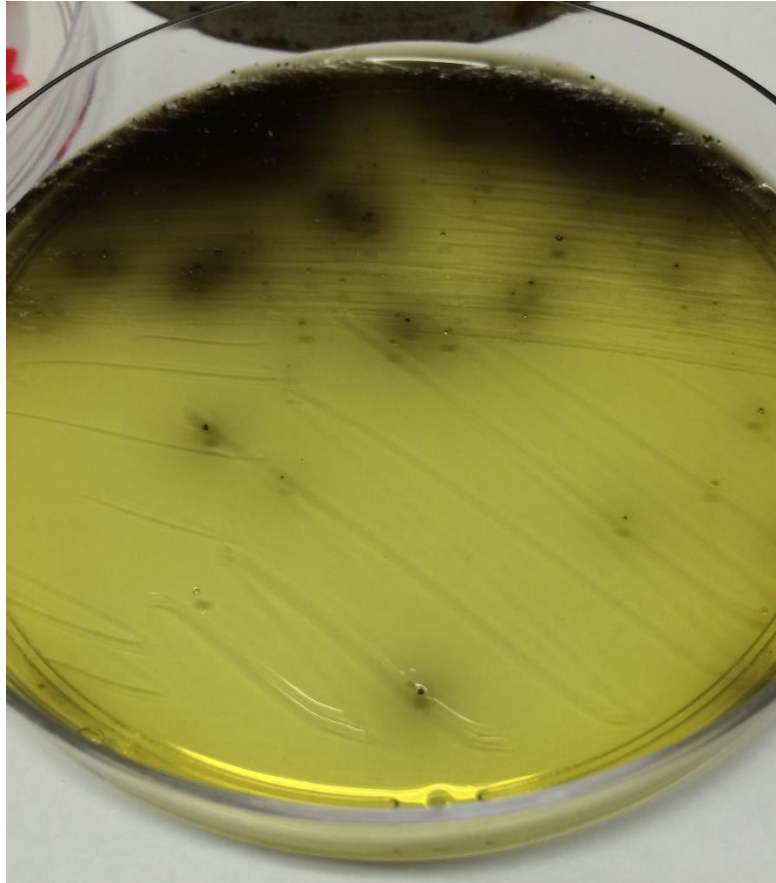
- **Isolamento de *Listeria* spp. (APHA, 2001)**

O protocolo de isolamento segue aquele preconizado pelo “*United States Department of Agriculture*” (USDA, 1996). A primeira fase é o enriquecimento seletivo primário. Para este, 25 gramas das amostras homogeneizadas, ao chegar ao laboratório, são depositadas em frascos contendo 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* spp. (LEB), incubando a 30°C por 24h.

Em seguida é feito o enriquecimento seletivo secundário. Após a incubação, então, é transferida uma alíquota de 0,1 mL do enriquecimento seletivo primário para frascos contendo 10 mL de caldo Fraser (com suplemento para *L. monocytogenes*), os quais são incubados a 35°C por 24h. Posteriormente, a partir do caldo de enriquecimento secundário, uma alçada da cultura é semeada em placas de Petri contendo Ágar Oxford Modificado (MOX), em forma de estrias de esgotamento. A incubação é de 35°C por 24h (USDA, 1996).

No ágar MOX, as colônias típicas de *Listeria* spp. são pequenas (em torno de 1 mm de diâmetro), possuem coloração negra e são rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina (Figura 9). De cada amostra, três a cinco colônias típicas de *Listeria* spp. são semeadas para confirmação com testes bioquímicos.

Figura 9. Placa MOX com colônias putativas de *Listeria* spp., negras, pequenas (1 mm) e rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina.



Fonte: Arquivo pessoal

- **Caracterização e identificação de *Clostridium* spp. patogênicos**

Para o isolamento de bactérias esporuladas do gênero *Clostridium*, são pesados 25 g de cada amostra e diluídas em vidros com tampa de rosca contendo 225 mL do meio de enriquecimento Cooked Meat Medium (CMM – DIFCO®), ajustado o pH para 7,2, previamente esterilizado e reduzido. Após inoculação, as amostras são submetidas a choque térmico em banho maria a temperatura de 80 °C, por um período de 10 min, resfriando-se em seguida a 30°C em água com gelo. Os vidros são hermeticamente fechados e incubados a 37°C em estufa bacteriológica, por um período de 24 - 48 h. Após este período, é observado crescimento por meio da turvação e produção de gás. Os tubos positivos são submetidos a esfregaços corados pelo método de Gram, visualizando morfologicamente bastonetes Gram-positivos com esporos ovais subterminais característicos do gênero *Clostridium*.

As amostras positivas são semeadas em 3 placas de Petri estéreis contendo o meio Ágar Reinforced Clostridial (RCA – OXOID®), sendo que 2

placas são incubadas por um período de 24 a 48 h em jarras de anaerobiose com o sistema Gás-Pak® e uma placa é incubada em aerobiose, para descartar a possibilidade de aeróbios (gênero *Bacillus*).

Após o período de incubação, as colônias apresentam crescimentos característicos de *Clostridium* sp, como centro ressaltado e cor levemente amarelada, opaca, com margens irregulares em forma rizóide, no ágar RCA. Essas colônias são repicadas para tubos de ensaio contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI – DIFCO®), acrescidos de 0,5% de cloridreto de cisteína (agente redutor) e incubados em anaerobiose a 37°C, por um período de 24 a 48 h. Após esse período, são realizados, novamente, esfregaços corados pelo método de Gram e o teste de catalase, para diferenciar as colônias de *Clostridium* sp de as *Bacillus* sp, já que os Clostrídios são bastonetes Gram positivos e catalase negativos, e os *Bacillus* sp, que são catalase positivos.

Posteriormente, são realizados os testes para caracterização bioquímica, a fim de identificar as espécies patogênicas do gênero *Clostridium* presentes em cada amostra. As provas são fermentação dos açúcares (glicose, maltose, lactose, sacarose); hidrólise da gelatina; teste da motilidade; produção de indol; produção de gás; redução de nitrato; atividade da lecitinase, lipase, hemólise.

Considerando que o *Clostridium botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens* produzem toxinas também pode ser realizado o teste biológico para a detecção de toxinas em camundongos criados em laboratório.

Citadas algumas análises, vale ressaltar que os critérios microbiológicos devem ter como base análises e recomendações científicas e, quando houver dados suficientes disponíveis, na análise de risco adequada ao alimento e a sua utilização. Os critérios microbiológicos também podem ser utilizados para determinar se os processos estão consistentes com os princípios gerais de higiene dos alimentos. Assim, a finalidade dos critérios microbiológicos é proteger a saúde pública, permitindo o fornecimento de alimentos seguros, íntegros e que satisfaçam os requisitos do comércio justo. No entanto, a presença de critérios pode não proteger a saúde do consumidor, uma vez que é possível um lote de alimento ser aceito mesmo contendo unidades

defeituosas. Os critérios microbiológicos podem ser aplicados em qualquer ponto da cadeia de alimentos, podendo também ser utilizados para examinar alimentos nos portos de entrada e no comércio varejista.

Assim, atualmente, a abordagem mais eficaz de segurança de alimentos tem por objetivo eliminar os patógenos alimentares e microrganismos deteriorantes por meio de uma atuação proativa, considerando desde os ingredientes até o produto final.

Diante disso, conforme Resolução DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal), do MAPA de maio de 2003, os procedimentos padrão de higiene operacional (PPHO) devem ser implantados nas indústrias de alimentos, a fim de reduzir e eliminar riscos associados com a contaminação, direta ou cruzada.

Recentemente, parte do programa de Boas Práticas de Fabricação, considerado pré-requisito para implantação do sistema APPCC, foi transformado em Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO). Os PPHO são alguns itens da BPF que, por sua importância para o controle de perigos, foram acrescentados de procedimentos de monitorização, ação corretiva, registros e verificação, para realmente possibilitar um controle efetivo. Fazem parte do PPHO, segurança da água, condições de higiene das superfícies de contato com o alimento, prevenção contra a contaminação cruzada, higiene dos empregados, proteção contra contaminantes e adulterantes, saúde dos empregados, controle integrado de pragas e registros (monitora as ocorrências de anormalidades e ações corretivas).

Todas as condições de higiene operacional devem ser monitoradas através de análises laboratoriais e seus dados registrados, devendo-se adotar ações corretivas sempre que se observarem desvios, sendo que os eles deverão ser registrados.

Nesse sentido, os PPHO visam reduzir ou eliminar riscos associados com a contaminação dos diferentes alimentos. São procedimentos descritos, desenvolvidos, implantados e monitorizados, visando estabelecer a forma rotineira pela qual o estabelecimento industrial evitará contaminação direta ou cruzada e a adulteração do produto, preservando a sua qualidade e integridade, por meio da higiene antes, durante e depois das operações industriais.

Deverão constar, nos planos do programa, todos os procedimentos de limpeza e sanitização, compreendendo: conservação e manutenção sanitária de instalações, equipamentos e utensílios; frequência; especificação e controle das substâncias detergentes e sanitizantes utilizadas e de sua forma de uso; forma de monitorização e suas respectivas frequências; aplicações de ações corretivas para eventuais desvios, garantindo, inclusive os eventuais destinos para os produtos não conformes; elaboração e manutenção do plano de implementação do PPHO, dos formulários e registros, dos documentos de monitorização e das ações corretivas adotadas. Todos os documentos deverão ser datados e assinados.

Os PPHO e as BPF são considerados parte dos pré-requisitos do sistema APPCC, devendo fazer parte do sistema de gestão de segurança de alimentos, podendo ser implantadas previamente ou em conjunto com este, dependendo da necessidade e realidade de cada organização. A legislação determina a obrigatoriedade da implantação gradativa em todas as indústrias de alimentos sob o Serviço de Inspeção Federal - SIF, do programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Além disso, a adesão aos PPHO e às BPF constitui medida efetiva de controle da contaminação e da multiplicação microbiana em alimentos.

Ainda, a indústria deve obedecer ao decreto nº 10.468/2020 do MAPA, que regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). Nesse decreto estão os requisitos sanitários para a industrialização, bem como as condições estruturais mínimas das dependências industriais. Ademais, apresenta todos os padrões de qualidade e identidade dos alimentos de origem animal, já comentados anteriormente, incluindo os procedimentos de inspeção e análises laboratoriais para cada tipo de matéria-prima. As embalagens, rótulos e os carimbos de inspeção também estão normatizados. Por fim, o RIISPOA aborda as responsabilidades, medidas cautelares, infrações e penalidades, temas importantes que orientam os procedimentos e mecanismos de fiscalização.

Assim, a higiene na indústria de alimentos é fundamental para o controle sanitário dos alimentos e para a segurança e a qualidade deles, evitando assim perdas econômicas (devido à deterioração e contaminação dos produtos por



microrganismos), recall, recolhimentos, crises e problemas relacionados à saúde pública.

Ainda, não se pode esquecer que, como já citado, são os métodos de conservação são importantes medidas de controle, fazendo com que o produto final saia de acordo com as especificações desejadas.

Portanto, hoje, o foco da segurança de alimentos está baseado na prevenção e no controle dos processos, e não mais no controle retrospectivo após a detecção da falha no processamento.

## **Capítulo 9 - Principais doenças veiculadas por alimentos e respectivos grupos de microrganismos envolvidos**

Além dos microrganismos indicadores, existem os patogênicos, ou seja, que podem causar infecção, intoxicação ou toxi-infecção em seres humanos, sendo, então, um problema de saúde pública. Os microrganismos infecciosos, como a *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli* patogênicas, compreendem aqueles que se multiplicam no trato intestinal humano e causam doenças. Já os intoxicantes, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, produzem toxinas, tanto nos alimentos quanto durante sua passagem pelo trato intestinal. Essa divisão é bastante útil, pois auxilia no reconhecimento das rotas da enfermidade alimentar.

Os patógenos de origem alimentar são microrganismos (bactérias, vírus e fungos), príons e parasitas, que são capazes de infectar os seres humanos por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados.

Nos últimos anos, as doenças causadas por patógenos de origem alimentar tornaram-se um importante problema de saúde pública no mundo, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade. A incidência global das doenças transmitidas por alimentos é difícil de estimar, mas foi relatado que cerca de uma a cada seis pessoas nos Estados Unidos (ou 48 milhões de pessoas) adoecem, sendo que desses, 128.000 são hospitalizados e 3.000 morrem anualmente, de acordo com o CDC. No Brasil, do ano de 2000 a 2017 foram relatados 12.503 surtos com 236.403 doentes e 182 óbitos.

Os sintomas mais comuns de DTA incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e, por vezes, febre. Na maioria dos casos, a duração pode variar de poucas horas até mais de cinco dias, dependendo do estado físico do paciente, do tipo e quantidades do microrganismo ou toxina ingeridos. Conforme o agente etiológico envolvido, o quadro clínico pode ser mais grave e prolongado, apresentando desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória.

Mesmo que a dificuldade de registro das DTA seja um problema mundial, os relatos oficiais demonstram um aumento significativo na ocorrência. Entre alguns dos fatores que contribuem para o aumento do registro dessas doenças, pode-se destacar: a) o aumento da população, b) o

aumento de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, c) o processo de urbanização desordenado, d) a produção e consumo de alimentos em condições inadequadas, e) o aumento da produção de alimentos e do comércio internacional, f) a melhoria dos sistemas de vigilância epidemiológica, e g) a melhoria dos métodos de diagnóstico e estrutura laboratorial para análises. Além desses fatores, podem ser incluídas outras causas que colaboram de forma menos expressiva para o aumento da ocorrência das DTA, como por exemplo, a utilização de novas modalidades de produção, o aumento no uso de aditivos, as mudanças dos hábitos alimentares, as alterações climáticas e ambientais, a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, em nível nacional e internacional.

A maioria dos microrganismos patogênicos de origem alimentar possui um potencial zoonótico com alto impacto ambiental pela produção animal intensiva e, conseqüentemente, o meio ambiente desempenha um papel muito importante na sua transmissão. Conseqüentemente, uma abordagem coordenada deve ser implementada para controlar os patógenos emergentes de origem alimentar na produção primária (saúde animal), na comunidade (saúde humana) e no meio ambiente (saúde ambiental), ou seja, dentro do conceito internacionalmente preconizado de “*One World, One Health*”. Sendo assim, este capítulo discutirá as bactérias, vírus, príons e parasitas que podem ser veiculados através do consumo de carnes.

### **Bactérias veiculadas nos alimentos**

As bactérias constituem um grupo microbiano de alta incidência, que apresenta ampla diversidade e virulência, fato que lhes confere grande importância frente à capacidade de provocar danos à saúde humana.

- *Salmonella* spp.

As salmonelas são bactérias em formato de bacilos, Gram-negativas, não encapsuladas, anaeróbias facultativas e que não esporulam. O gênero *Salmonella* é o mais importante da família *Enterobacteriaceae*, sendo composto pelas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella entérica*, a qual é subdividida em seis subespécies, sendo reconhecidos mais de 2.500 sorovares, sendo os principais *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium,

*Salmonella Typhi*, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Javiana e *Salmonella* Heidelberg.

*Salmonella* Enteritidis é o sorotipo mais comum e também o mais frequentemente associado com aves e conseqüentemente na carne de frango. Os sorotipos Pullorum e Gallinarum foram endêmicos em criações de aves mas foram minimizados por meio de programas de controle e erradicação. *Salmonella* Enteritidis infecta o trato gastrointestinal das aves. Quando essas aves são abatidas, a *Salmonella* é transmitida do trato intestinal para a carne, quando más práticas de higiene são observadas. Os ovos podem ser contaminados pela casca, por matéria fecal eliminada durante a postura ou também internamente, pois a *S. Enteritidis* contamina os ovários das galinhas (transmissão transovariana). Nos últimos 3 anos, surtos de Enteritidis ocorridos nos Estados Unidos foram vinculados a ovos, brotos de alfafa, pinhões e carne moída.

A apresentação clínica mais comum da infecção por *Salmonella* spp. é gastroenterite com náuseas, vômitos, cefaleia, cólicas abdominais, diarreia e, às vezes, febre. É caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade, exceto para indivíduos em risco. Na verdade, aproximadamente 5 a 10% dos pacientes desenvolvem infecções invasivas por *Salmonella* spp., que podem progredir para bacteremia e doenças extragastrointestinais graves.

A maioria dos casos de salmonelose ocorre pela ingestão de alimentos preparados e armazenados inadequadamente, o que contribui para a multiplicação do agente e aumento da dose ingerida, sendo que um dos principais alimentos envolvidos é a carne.

Altas taxas de contaminação por *Salmonella* spp. em uma ampla variedade de carnes cruas e produtos de carne processados e a detecção de múltiplos sorovares destacam a falta de higiene no varejo. É verdade que a contaminação da carne crua com *Salmonella* spp. não é considerada um grande risco para o consumidor, porque espera-se que o alimento seja bem cozido antes do consumo, o que inviabiliza essas bactérias. O fator de risco significativo para a saúde humana é representado pela contaminação cruzada, pelo consumo de carne cru e pela presença deste importante microrganismo em produtos prontos para o consumo. Assim, para garantir a segurança da carne e seus derivados para consumo humano, deve-se adotar a vigilância por

meio de um sistema contínuo da “fazenda-para-o-garfo”. Estudos epidemiológicos e microbiológicos nacionais detalhados devem ser realizados para avaliar a prevalência de *Salmonella* spp. nas carnes e para determinar os diferentes sorovares e a relação entre a produção de alimentos e surtos de salmonelose em seres humanos.

- *Campylobacter* spp.

*Campylobacter* são bactérias Gram-negativas, microaerófilas, curvadas em espiral, as quais requerem condições de cultivo com baixo teor de oxigênio e alto teor de dióxido de carbono. Atualmente, o gênero é composto por 17 espécies, subespécies e biótipos oficialmente e as cepas mais frequentemente associadas com doenças humanas pertencem às espécies catalase positivas *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. cinaedi* e *C. fennelliae*.

Essas diferentes espécies de *Campylobacter* estão associados a animais de sangue quente, sendo comensais do trato gastrintestinal de bovinos, suínos, ovinos, felinos, cães, roedores silvestres e domésticos, aves domésticas e pássaros. Foi demonstrado que um grande percentual dos animais possui esse microrganismo nas fezes. As aves constituem o principal reservatório de *C. jejuni*, sendo possível encontrá-lo em fezes e carcaças de aves. As aves são portadoras naturais de *Campylobacter*, no entanto, não apresentam sinais clínicos da enfermidade. O suíno é o principal portador de *C. coli*, podendo ter *C. jejuni* como comensal habitual. Como esse microrganismo está naturalmente no trato gastrointestinal destes animais, a contaminação das carnes é plausível, e muitos casos de enterite humana estão associados ao consumo de alimentos de origem animal ou água contaminados, ou resultantes do contato com animais.

Campilobacteriose é uma das principais doenças bacterianas transmitidas por alimentos, principalmente carne de aves, em diversos países, alguns dos quais notificam números superiores aos casos de salmonelose. A infecção causada por *Campylobacter* spp. geralmente se manifesta de 2 a 5 dias após a ingestão de carnes contaminadas, podendo causar tanto doença intestinal, quanto extraintestinal. *C. jejuni* normalmente causa uma enterite aguda em indivíduos sadios após 1 a 7 dias de incubação. A doença dura de alguns dias até várias semanas e costuma ser autolimitante. Os sintomas

podem ser tanto sistêmicos (febre, cefaleia, mialgia) como intestinais (contrações abdominais e diarreia que pode ou não conter sangue). Após a ingestão da carne contaminada, a ocorrência de complicações é rara, entretanto esses casos podem desencadear sepse, síndrome de Guillain-Barré (GBS), síndrome de Miller Fisher e síndrome de Reiter.

Vale ressaltar que há risco de contaminação cruzada, pois *Campylobacter* spp. é capaz de sobreviver por mais de 1 hora nas bancadas e em panos de cozinha, sendo possível contaminar outros alimentos que entrem em contato com estas superfícies. A adoção de estratégias de prevenção pode ser um dos principais fatores para o controle da campilobacteriose, incluindo como tais medidas, a educação pública para diminuir o risco e a contaminação cruzada em cozinhas industriais e domésticas, a melhoria das práticas tecnológicas e higiênico-sanitárias nos abatedouros, a avaliação de risco microbiológico nas indústrias e o controle zoonosológico nas fazendas para reduzir a infecção nos galpões de aves, além de uma rotina de estratégia de prevenção.

- *Escherichia coli*

A presença de *E. coli* é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e a presença de outras bactérias enteropatogênicas. Entretanto, alguns grupos de *E. coli* são patogênicos e podem ser transmitidos aos seres humanos por alimentos. Assim, mesmo em quantidades reduzidas, podem tornar-se significativas, em especial quando as condições do alimento no qual se encontram permitem sua multiplicação.

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo considerada a espécie predominante entre os microrganismos anaeróbios facultativos da microbiota intestinal de animais de sangue quente. *E. coli* associadas à infecção intestinal e causadoras de diarreia em humanos são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas e são classificadas em seis classes: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), subdividida em EPEC típicas e atípicas (tEPEC e aEPEC), shigatoxigênica (STEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC).

Muitos pesquisadores enfatizam que a presença dessa bactéria em produtos de origem animal pode ser devido à contaminação através do manipulador, utensílios, fezes do animal e local de abate contaminado. Os resultados ainda revelam as condições precárias de higiene desses alimentos e o risco que a população está exposta ao consumi-lo, principalmente se não for preparado adequadamente.

- *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva, formadora de endósporos, em forma de bastonete, e uma das causas mais comuns causadoras de surtos de origem alimentar. Devido a sua capacidade de esporular, são resistentes ao cozimento ou pasteurização, sendo que os esporos, posteriormente, podem passar por germinação e multiplicação de células vegetativas. Inclusive, a resistência de seus esporos às condições ambientais adversas permitiu que se distribuisse amplamente no meio ambiente (solo, rizosfera, poeira e água) e também em uma variedade de alimentos, como arroz, especiarias, leite e produtos lácteos, vegetais, carnes e derivados, bolos e outras sobremesas.

Alimentos de origem animal, como carnes e derivados, são parte importante da dieta, portanto a contaminação e multiplicação de *B. cereus* em carnes cruas e seus produtos é motivo de preocupação à saúde pública. Isso porque, esse microrganismo é capaz de causar as síndromes diarreica e emética através da ingestão de alimentos contaminados.

Embora *B. cereus* esteja implicado em muitos surtos de doenças transmitidas por alimentos em muitos países, no entanto, apenas alguns casos são relatados porque os sintomas são principalmente semelhantes à intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. Sendo assim, uma vigilância epidemiológica mais rígida deve ser realizada.

- *Staphylococcus aureus*

Morfologicamente, os *Staphylococcus aureus* caracterizam-se como cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos, imóveis, não esporulados, catalase e termonuclease positivas, produtores ou não da enzima coagulase. É um patógeno comensal e oportunista, que pode causar um amplo espectro de

doenças. É, inclusive, considerada a terceira causa mais importante entre as doenças transmitidas por alimentos.

A multiplicação de *S. aureus* em alimentos apresenta um potencial perigo para a saúde pública porque muitas cepas produzem enterotoxinas (SEs) que causam intoxicação alimentar se ingeridas. As SEs são notavelmente resistentes ao calor, sobrevivendo de 3 min a 8 min a 121 ° C. Como resultado, elas podem estar presentes nos alimentos mesmo quando *S. aureus* viáveis estão ausentes.

Vale lembrar que, *S. aureus* é um microrganismo relacionado com mãos, boca, pele, entre outras. Assim, altas quantidades deste indica um manuseio inadequado na produção de alimentos, nas etapas de preparo e processamento, os quais pode levar à disseminação das bactérias. A prevalência relativamente alta de alguns genes clássicos de enterotoxinas revela o poder potencial dessa bactéria em causar intoxicação alimentar.

- *Clostridium spp.*

*Clostridium spp.* é um gênero de bactérias Gram-positivas, anaeróbias, em forma de bastonetes, produtoras de esporos e, conseqüentemente, altamente resistente. Muitas espécies produzem potentes toxinas, como é o caso do *C. botulinum*, que é responsável pelo botulismo em humanos e animais.

Os surtos de botulismo são descritos em todos os continentes devido ao consumo de alimentos que apresentam condições de anaerobiose e/ou baixa acidez. O número de casos de botulismo e a letalidade tem diminuído devido a utilização do soro antitoxina botulínica, mas essa doença ainda existe e provoca riscos à saúde pública.

Surtos de botulismo estão associados com diferentes alimentos, como embutidos, tais como salsichas, salames, presuntos e patês, e conservas de baixa acidez. Além disso, também estão relacionados com derivados do leite e enlatados, bem como produtos fermentados, e o mel.

Outra espécie importante dentro deste gênero é o *Clostridium perfringens*, que pode provocar toxinfecção alimentar no ser humano. Além disso,



Ingerir alimentos contaminados com *C. perfringens*, especialmente com as cepas produtoras de enterotoxinas, pode causar toxinfecção em humanos e levar à diarreia aquosa e intensa dor abdominal.

A clostridiose alimentar em humanos causa uma dor abdominal de média intensidade por um curto período de tempo e, em mais de 90% dos casos, acompanhada de diarreia. O período de incubação é de 6 a 24 horas, mais frequentemente de 10 a 12 horas, durando em torno de 24 horas em maior parte da população, e nos idosos pode durar até duas semanas.

Os surtos normalmente são reportados após o consumo de refeições preparadas para um grande número de pessoas, normalmente envolvendo pratos à base de carne ou frango, mantidos sob temperatura inadequada após seu cozimento.

- *Vibrio* spp.

As espécies de *Vibrio* spp. são a principal causa de gastroenterite e septicemia em humanos. O gênero *Vibrio* pertence à família *Vibrionaceae*, são microrganismos habitantes naturais de ambientes aquáticos, de clima tropical e temperado, presentes em água salgada, salobra e doce, podendo, também, estar presentes em moluscos bivalves e outros crustáceos.

As espécies que constituem o gênero *Vibrio* spp. são bacilos Gram-negativos, curvos ou retos, não formadores de esporos, anaeróbicas facultativas. A maioria das espécies patogênicas é móvel, possuindo flagelo único e polar. Ademais, fermentam glicose sem produção de gás e são catalase positivos.

O gênero *Vibrio* inclui mais de 30 espécies, das quais ao menos 14 são reconhecidas patogênicas para o homem, entre elas *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*. A presença desses microrganismos indica que o alimento pode estar contaminada pelo conteúdo visceral e os consumidores expostos ao risco de contrair doenças de origem alimentar quando consumidos crus.

- *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* é um bastonete Gram-positivo pequeno com extremidades arredondadas e não produz esporos ou cápsula. É uma bactéria

psicrotrófica, imóvel quando cultivada entre 20 e 25° C e imóvel ou apresenta fraca motilidade a 37 °C.

O gênero *Listeria* compreende pelo menos as espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* das quais somente *L. monocytogenes* é considerada consistentemente patogênica para o homem, embora infecções ocasionais por *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* venham sendo relatadas.

O solo e vegetais em decomposição são os principais reservatórios da *L. monocytogenes*, que tem sido isolada de hortaliças, água doce, esgoto e do material fecal de várias espécies de mamíferos, aves e peixes, em geral portadores assintomáticos, que liberam a bactéria nas fezes. Isso explica o fato dessa bactéria ser facilmente encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, “in natura” ou processados.

Assim, a listeriose resulta, principalmente, da ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* geralmente processados, armazenados sob refrigeração por longos períodos e consumidos sem aquecimento.

- *Brucella* spp.

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa, que pode infectar tanto animais quanto o homem, sendo considerada uma zoonose de distribuição universal, acarretando problemas sanitários e prejuízos econômicos importantes.

As bactérias do gênero *Brucella* spp. são cocobacilos pequenos, Gram-negativos, não formadores de esporos. São parasitas intracelulares facultativos, CO<sub>2</sub> dependentes, que invadem e se replicam em fagócitos. São em geral hospedeiro específicas, e as principais cepas envolvidas em infecções no homem são: *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. neotomae* (roedores), *B. canis* (cães) e *B. ovis* (ovinos).

A transmissão da brucelose para o homem ocorre principalmente, pelo contato direto ou indireto com animais infectados. No entanto, a ingestão de produtos de origem animal contaminados, como carnes, também são uma via de transmissão, entretanto sabe-se que o consumo de leite ou derivados crus possui maior relevância.

Após o contato com o agente, o período de incubação da doença em geral fica em torno de 1 a 3 semanas, mas os primeiros sintomas podem surgir após meses. Os sintomas são em geral inespecíficos, e podem incluir febre, suores noturnos, debilidade, insônia, anorexia e dor de cabeça. A doença pode ser subdividida em forma aguda, subaguda e crônica, a forma aguda sendo caracterizada por febre, sudorese e dor (artralgias, mialgias e cefaleia). Já a forma crônica tem evolução longa e é marcada por recidivas. A doença pode atingir qualquer órgão ou sistema, porém na forma crônica predomina em órgãos específicos, particularmente lesões ósteo-articulares, porém também podem provocar lesões no sistema-nervoso (meninges), uro-genital, hepatobiliar, cutâneo, hematológico, respiratório e oftalmológico.

- *Mycobacterium* spp.

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium*. São bacilos curtos, não formadores de esporo, imóveis, não capsulados, não flagelados e aeróbicos (embora algumas espécies possam crescer em concentração reduzida de oxigênio).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (mtBc) é composto pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. O *M. tuberculosis* e o *M. bovis* se destacam por serem os agentes causadores da tuberculose humana e bovina, respectivamente, mas ocorre transmissão entre ambos hospedeiros das duas espécies. A espécie infectante bovina é a mais perigosa dentre as espécies desse complexo, sendo capaz de infectar muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem.

Portanto, a tuberculose bovina é uma zoonose, que pode ser transmitida pela via aerógena, mediante a inalação do *M. bovis* suspenso no ar, e indiretamente, pelo consumo de carne e leite e derivados não pasteurizados.

A forma mais comum de manifestação da tuberculose bovina ao ser transmitida para o homem, é a extrapulmonar, sendo as crianças as mais facilmente infectadas, devido à ingestão de lácteos contaminados, causando uma adenite cervical, infecções do trato genito-urinário, alterações ósseas e meningite. A forma pulmonar pode ser transmitida ao homem pela via

aerógena, propiciada pelo contato com esses animais infectados, seja no momento da ordenha ou manejo diário, ou em abatedouros frigoríficos. O abdômen é o sítio anatômico mais afetado em pacientes com tuberculose extrapulmonar, sendo que a área mais afetada são os linfonodos mesentéricos, seguidos das vísceras e por fim do trato gastrointestinal.

O sintoma clínico mais freqüente, nesses casos, é a diarréia, embora febre, suores noturnos, dores e distensão abdominal, anorexia, melena, sangramento retal e perda de peso ocorram com menor frequência.

### **Vírus veiculados por alimentos**

Diversos vírus têm potencial zoonótico ou são de importância econômica por infectarem os animais de produção. Estudos com o objetivo de estudar os vírus com potencial zoonótico revelaram seu potencial de expansão, com uma média de três a quatro novos patógenos zoonóticos identificados a cada ano.

Os vírus de importância econômica, devido à sua capacidade de infectar e causar doenças em espécies animais de produção e, conseqüentemente alimentos, há muito tempo são listados por organizações internacionais, como a Organização Mundial da Saúde Animal (WOAH, antiga OIE), com medidas sanitárias regulamentares associadas.

Sabe-se que a maioria dos vírus veiculados por alimentos são de RNA, não tem envelope, apresentam uma alta resistência a estressores ambientais, como calor, pH alto ou baixo, secagem, luz e exposição aos raios ultravioletas. Essa persistência permite que eles permaneçam infectantes em alimentos por períodos de 2 dias a 4 semanas. Além disso, a maioria dos vírus transmitidos por alimentos tem doses infectantes supostamente muito baixas, oscilando de 10 a 100 partículas virais (164).

Vírus de origem alimentar entéricos, patogênicos humanos, como norovírus (NoV), rotavírus, (RoV), vírus da hepatite A e E (HAV e HEV, respectivamente) são os principais vírus associados às infecções de origem alimentar

- Norovírus

O norovírus (NoV) pertence à família dos *Caliciviridae* e é a segunda principal causa de casos esporádicos e de surtos relatados de gastroenterite

viral aguda mundialmente. Até 93% dos surtos de gastroenterite em países desenvolvidos estão associados a NoV.

Além disso, pode infectar pessoas de todas as idades, mas afeta predominantemente crianças e idosos. Os sintomas do NoV incluem diarreia, vômito, náusea, dor de estômago, bem como febre, dor de cabeça e dores no corpo, embora as infecções por NoV também possam ser assintomáticas. A transmissão ocorre principalmente por meio do contato direto pessoa a pessoa, via fecal-oral e consumo de alimentos ou água contaminados, sendo que ela possui uma dose infecciosa extremamente baixa (18 a 1.000 partículas virais). E, vale lembrar que, a eliminação viral continua muito depois da doença.

- Rotavírus

O rotavírus é reconhecido como uma das principais causas de gastroenterite não bacteriana, especialmente em bebês e crianças. Quase todas as crianças já tiveram uma infecção por rotavírus até os 5 anos de idade. Ele também foi implicado como agente etiológico da diarreia em crianças mais velhas, humanos adultos, animais jovens e adultos, incluindo bezerros e leitões.

É uma doença altamente contagiosa que pode levar à desidratação severa (perda de fluidos corporais) e até mesmo à morte. O rotavírus é endêmico em todo o mundo e a infecção está associada a altas taxas de morbidade e altas taxas de mortalidade em países em desenvolvimento. Em países em desenvolvimento, a gastroenterite por rotavírus é responsável por mais de 800.000 mortes infantis por ano devido à má nutrição e cuidados de saúde.

A transmissão acontece pela via fecal-oral, de pessoa para pessoa, ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes ou também por gotículas respiratórias. A gastroenterite por rotavírus é uma doença leve a grave, uma vez que uma criança que é exposta à infecção por rotavírus, leva cerca de 1 a 2 dias (período de incubação) antes dos sintomas iniciarem, os quais geralmente começam com febre, náuseas e vômitos, seguidos por cólicas abdominais e diarreia aquosa frequente (que pode durar de 3 a 8 dias). Além disso, crianças infectadas também podem ter tosse e coriza. A diarreia,

especialmente quando ocorre junto com o vômito, pode levar rapidamente à desidratação em bebês e crianças pequenas.

- Vírus da hepatite

As hepatites virais são doenças provocadas por diferentes vírus (principalmente o vírus da Hepatite A - VHA, o vírus da Hepatite B - VHB, o vírus da Hepatite C – VHC, o Vírus da Hepatite D – VHD e o Vírus da Hepatite E) que têm em comum o acometimento grave do fígado humanos. Elas são consideradas como um grave problema de saúde pública no mundo e, em especial, no Brasil, devido ao número de casos confirmados a cada ano e possibilidade de complicações das formas agudas e crônicas. Essas complicações incluem a cirrose e o câncer no fígado. Além disso, não são poucas as mortes que causam.

O vírus da hepatite A (HAV) pertence à família *Picornaviridae* e é classificado no gênero *Hepatovirus*, pode causar insuficiência hepática aguda, que pode ser fatal. O curso da hepatite A varia de leve a grave, e é mais grave em adultos do que em crianças (menor que 6 anos), as quais costumam ser assintomáticas. Os sintomas comuns associados à infecção aguda são perda de apetite, febre, cefaleia, náusea, diarreia, desconforto abdominal, anorexia, mialgia, urina de cor escura e icterícia. A infecção por HAV desenvolve imunidade permanente e não resulta em infecção crônica de doença hepática. Adultos com hepatite A geralmente desenvolvem sintomas após um longo período de incubação de 14-28 dias (até 50 dias) após a exposição e um grande número de partículas do vírus são excretados por grama de fezes.

O HAV é excretado nas fezes e a principal via de transmissão é de pessoa para pessoa pela via fecal-oral. Além disso, o HAV pode ser transmitido pela ingestão de alimentos ou água contaminados e ambientes fechados, sendo que restaurantes e serviços de bufê são os locais mais frequentes de surtos de HAV.

Apesar da prevalência do HAV em alimentos ser relativamente baixa, o risco associado à infecção é alto. No entanto, considerando que os alimentos podem ser originários de locais muito distantes, usados como ingredientes em uma grande variedade de alimentos, os surtos dificilmente foram associados à fonte de contaminação em tempo hábil. As categorias mais comuns de

alimentos associadas a surtos são mariscos, folhas verdes e frutas frescas e congeladas. No entanto, qualquer alimento pode estar implicado em surtos devido ao potencial de contaminação cruzada e manipulação indevida.

O vírus da hepatite E (HEV) foi isolado em um número crescente de espécies animais como suínos, galinhas, veados, ratos, javalis, macacos, coelhos, furões e morcegos. Todas essas espécies animais são potencialmente hospedeiros naturais de HEV, mas apenas suínos domésticos, javalis e veados foram identificadas como verdadeiros reservatórios.

A transmissão alimentar do HEV foi demonstrada pela primeira vez em grupos de pacientes japoneses após comer carne crua ou malcozida de suínos, javalis ou veados. Os hepatócitos são considerados as células-alvo primárias nas quais o vírus se replica no citoplasma. Com base na falta de um sistema de cultura de células eficiente, o mecanismo pelo qual o HEV entra nas células e como o vírion é liberado das células ainda não é totalmente compreendido.

Em humanos, as infecções por HEV geralmente seguem um curso assintomático, mas após um período de incubação de 4-9 semanas, a doença pode se apresentar como uma hepatite viral icterícia aguda. Os sintomas frequentemente observados incluem anorexia, náusea, icterícia, febre e dor abdominal. As taxas de mortalidade são geralmente abaixo de 0,5%, mas podem chegar a até 25% em mulheres grávidas (195).

Os vírus da hepatite E são frequentemente transmitidos por via alimentar e por meio de rotas ambientais. O real papel dessas vias de transmissão na disseminação do HEV pode depender do genótipo do vírus, das condições ambientais, das condições de higiene e dos tipos de alimentos consumidos. Assim, é de suma importância que sejam criadas estratégias precisas de prevenção e controle da infecção pelo HEV e proteção da saúde pública.

### **Fungos e leveduras veiculados por alimentos**

Muitos alimentos são frequentemente contaminados por fungos que podem causar desde reações leves até quadros que podem levar o indivíduo ao óbito.

Alguns fungos são capazes de produzir toxinas que causam prejuízos, principalmente em consumo prolongado. Aflatoxina é uma das micotoxinas

(toxinas produzidas por fungos) mais conhecidas, que pode provocar o desenvolvimento de câncer de fígado pelo consumo prolongado. A toxina pode ainda causar sintomas agudos, causando intoxicações graves, levando à morte.

Entre os fungos mais importantes para alimentos existem os bolores e leveduras. Ambos podem causar putrefação, mas também são muito usados na produção de alimentos (queijo, pão, vinho, cerveja, etc.). Os bolores produzem toxinas conhecidas como micotoxinas que serão estudadas adiante, pois são considerados perigos químicos. Já as leveduras não estão relacionadas a problemas de segurança de alimentos. As doenças causadas por esses micro-organismos são de transmissão direta ou oportunistas e se manifestam quando o indivíduo está imunologicamente debilitado.

A alta prevalência das doenças transmitidas por alimentos em muitos países em desenvolvimento sugere grandes problemas de segurança alimentar subjacentes; portanto, é importante detectar patógenos de origem alimentar para reduzir a ocorrência dessas doenças. Apesar disso, relatos nacionais e internacionais demonstram que a maioria dos casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) não são notificadas às autoridades sanitárias, pois muitos desses patógenos alimentares causam sintomas brandos, fazendo com que a vítima não busque auxílio médico e não haja notificação.

Vale ressaltar também, que o mais importante em DTA é a prevenção das mesmas. Isso porque, os custos de prevenção são infimamente menores que os de tratamento. Assim, boas práticas de fabricação (BPF) e implementando o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Assim, reduzir-se-á a níveis aceitáveis, e com controle microbiano nos locais críticos. Ainda, são usados diferentes métodos de conservação, como já comentado, fazendo com que o produto final saia de acordo com as especificações desejadas.



## **Capítulo 10 - Segurança de alimentos e Vigilância em Saúde - notificação, investigação de surtos e atuação multiprofissional**

Doenças transmitidas por alimentos e água (DTAA) são aquelas causadas pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados. Atualmente, existem mais de 250 tipos de DTAA no mundo, podendo ser causadas por fungos, bactérias e suas toxinas, vírus, parasitas intestinais oportunistas ou substâncias químicas. É considerado surto quando duas ou mais pessoas apresentam doença ou sinais e sintomas semelhantes após ingerirem alimentos e/ou água da mesma origem, normalmente em um mesmo local. Para doenças de alta gravidade, como botulismo e cólera, a confirmação de apenas um caso já é considerada surto.

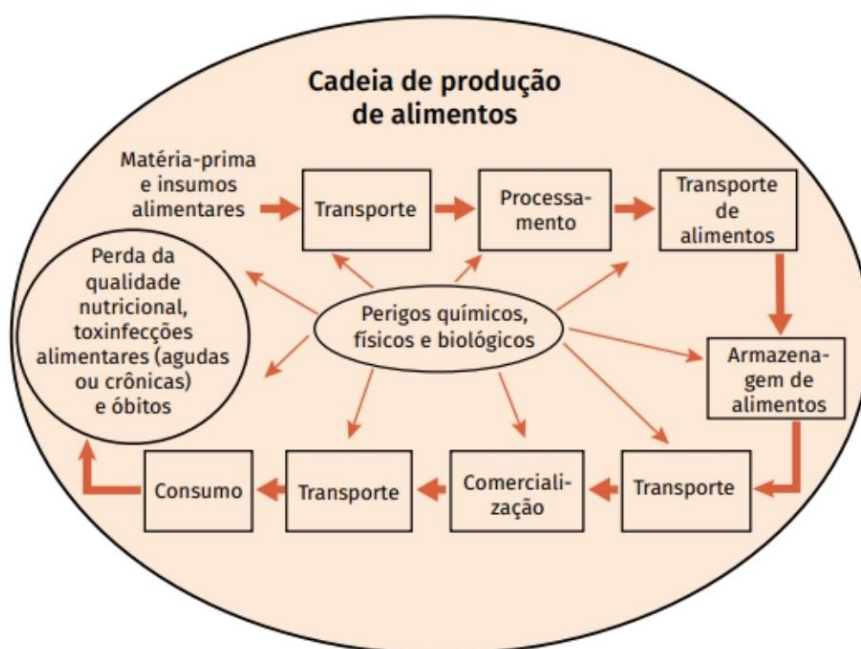
A maioria dos surtos tem sido relacionada à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração organoléptica visível. Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de microrganismos necessária para degradar os alimentos. Esses fatos dificultam a rastreabilidade dos alimentos causadores de surtos, uma vez que os consumidores afetados dificilmente conseguem identificar sensorialmente os alimentos fonte da DTAA. Alimentos com características organolépticas alteradas dificilmente causam surtos alimentares, uma vez que não são consumidos devido à sensação repulsiva que causam aos consumidores.

Além disso, não há um quadro clínico específico para os surtos de DTAA, podendo variar de acordo com o agente etiológico envolvido. No entanto, os sinais e sintomas mais comuns são: náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, falta de apetite, febre. E, além desses, podem ocorrer também afecções extraintestinais em diferentes órgãos e sistemas como nos rins (no caso da síndrome hemolítica urêmica, causada pela *E. coli* O157:H7), sistema nervoso central (botulismo, toxoplasmose e listeriose), má formação congênita (toxoplasmose), dentre outros.

Os surtos de DTAA decorrem de erros ocorridos durante o processo de produção de alimentos (Figura 10), incluindo as falhas humanas no manuseio de alimentos e água, que podem acontecer em nível industrial, comercial ou

domiciliar. As DTAAAs causam um grande impacto na economia do sistema de saúde, mas sobretudo na qualidade de vida das pessoas, que, durante o período da doença, ficam incapacitadas para trabalhar ou fazer suas atividades diárias, além de demandarem serviços médicos e medicamentos.

Figura 10. Etapas que compõem a cadeia alimentar de produção e os potenciais riscos de contaminação em cada uma delas.



Fonte: Livro Higiene e controle sanitário de alimentos. Venturi, I., *et al.*, 2021

Assim, investigar adequadamente os surtos de DTAAAs visa a garantir que a produção alimentar ocorra de maneira apropriada, obedecendo aos padrões de higiene estabelecidos. Com isso, é possível minimizar as consequências dos surtos para a saúde pública e para a população em geral. Ademais, essas investigações fornecem informações para o desenvolvimento de medidas de controle e prevenção dessas doenças, sejam elas em nível local, regional, nacional ou, até mesmo, internacional.

Com relação ao controle internacional dos perigos microbiológicos em alimentos, os Regulamentos Internacionais de Saúde (IHR) foram acordados pela comunidade internacional em 1969 e aprovados pela Organização

Mundial da Saúde (OMS, World Health Organisation – WHO), no mesmo ano. Esses regulamentos formam uma estrutura de regulamentação para a segurança da saúde pública global, baseada na prevenção da propagação de doenças infecciosas em nível internacional. Os IHR inicialmente exigiam dos estados-membros que reportassem à OMS todos os casos de cólera, praga e febre amarela. No entanto, a revisão dos IHR (2005), que entrou em vigor em 15 de junho de 2007, incluiu a contaminação de alimentos e os eventos de doenças transmitidas por alimentos. Os IHR requerem que a OMS seja notificada de todas as emergências de saúde pública de interesse internacional e incluem orientações para procedimentos de vigilância e resposta às emergências de saúde pública.

Assim, o Departamento de Inocuidade Alimentar da OMS pode fornecer orientações aos estados-membros. Esse também é o ponto focal para a colaboração da OMS com a FAO na Comissão do Codex Alimentarius. O Comitê de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA) e o Encontro Conjunto da FAO/OMS sobre Resíduos de Pesticidas (JMPPR) avaliam os riscos associados com produtos químicos em alimentos, para uso nos estados-membros e para a Comissão do Codex Alimentarius. A avaliação de risco de agentes microbiológicos em alimentos acontece por meio do Grupo de Especialistas da FAO/OMS sobre Avaliação de Risco Microbiológico (JEMRA). O Departamento de Inocuidade de Alimentos da OMS pode, assim, fornecer pareceres vindos de especialistas para advertir sobre ameaças químicas e microbiológicas em alimentos. Avaliação de risco e aconselhamento técnico são necessários para verificar qualquer ameaça de terrorismo alimentar e assegurar que exista preparo internacional e respostas a emergências em níveis adequados.

Isso porque, o incremento do comércio internacional de alimentos tem aumentado o risco de transmissão de agentes infecciosos através das fronteiras e ressaltam a necessidade da existência da avaliação de risco internacional para estimar o risco que os patógenos microbianos representam para a saúde humana. A globalização e a liberalização do comércio mundial de alimentos, ao mesmo tempo em que oferece muitos benefícios e oportunidades, também apresenta novos riscos, sendo que um exemplo disso foi a última pandemia do Covid-19. Em virtude da natureza global da produção,

fabricação e comercialização de alimentos, os agentes infecciosos podem ser disseminados do ponto original de processamento e empacotamento até localidades a milhares de quilômetros de distância. Sendo assim, para reduzir esse risco, é importante que a execução de boas práticas seja obrigatória.

De acordo com a Resolução no 216, de 15 de setembro de 2004, boas práticas são “[...] procedimentos que devem ser adotados por serviços de alimentação a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com a legislação sanitária” (BRASIL, 2004). Ou seja, os estabelecimentos que manipulam, expõem e vendem alimentos devem seguir normas higiênico-sanitárias para zelar pela qualidade sanitária dos alimentos que serão vendidos ao consumidor final, de modo que eles não causem nenhum tipo de dano à saúde de algum indivíduo ou de um grupo de pessoas.

Quando essas boas práticas de fabricação não são realizadas adequadamente ou mesmo quando ocorre falha em outras etapas como no transporte ou comercialização, pode haver uma alteração do alimento e, conseqüentemente, surgir um surto, necessitando, assim, de um estudo epidemiológico.

O estudo epidemiológico baseia-se na coleta e avaliação de dados preexistentes e formulação de hipóteses e, posteriormente, na realização de observações pessoais para poder induzir ou inferir sobre o observado, com o objetivo de sugerir associações ou relações para a elaboração de novas hipóteses. Após isso, analisa-se os dados, para testar o verdadeiro valor da hipótese formulada. Assim, o estudo epidemiológico busca obter resposta para as seguintes questões: Qual o evento ou fenômeno? Quais os indivíduos envolvidos? Quando, onde, como e por que ocorreu? Como evitar a ocorrência do fenômeno?

Assim, a investigação epidemiológica é a etapa de investigação em que são utilizados formulários específicos, incluindo entrevista com os envolvidos no surto de DTAA, tanto os que ficaram doentes quanto os que não ficaram. Sob responsabilidade da Vigilância Epidemiológica, essa etapa é importante para facilitar a identificação do agente etiológico causador do surto alimentar. Complementar à investigação epidemiológica, a investigação laboratorial é a etapa em que são coletadas amostras de alimentos para identificar os possíveis alimentos/preparações envolvidos no surto. Ademais, também são

coletadas amostras de água para análise e utensílios usados no processo de produção do alimento, bem como amostras clínicas das pessoas que ficaram doentes. Por fim, na investigação integrada, são reunidas as informações coletadas pelas vigilâncias sanitária, epidemiológica e laboratorial. Ou seja, nessa etapa as informações obtidas são integradas para diagnosticar o problema.

Então, na primeira etapa de investigação, ocorre o planejamento do trabalho em campo, preenchendo-se um formulário com informações fornecidas pelas pessoas envolvidas no surto, levando em conta todas as informações clínicas das pessoas que adoeceram, devendo-se considerar a presença de sintomas clínicos semelhantes entre elas, como diarreia, vômito, febre e dores abdominais. Além disso, também é importante buscar informações sobre outras pessoas que estavam no mesmo local em que as pessoas doentes estiveram (como uma festa ou um restaurante). Nessa etapa, são coletadas as amostras de alimentos e água e são enviadas para o laboratório.

A segunda etapa corresponde à confirmação da existência de surto, que pode ser caracterizado por lugar (ocorre quando há vários casos em locais diferentes, mas no mesmo espaço de tempo) ou por pessoa (identificam-se as características do grupo envolvido no surto, como faixa etária, sexo, hábitos culturais, uso de medicação, etc., sendo que essas informações são importantes para que se possa traçar o perfil de grupos de risco e risco de exposição). Nessa etapa, é imprescindível que o local do ocorrido seja vistoriado de acordo com o roteiro de inspeção, verificando-se a execução de boas práticas e os possíveis pontos críticos, para identificação de fatores de risco que colocam o alimento em condições inadequadas para o consumo, descrevendo, assim, irregularidades e, proceder, caso necessário, a interdição do local a fim de evitar a ocorrência de novos surtos.

Na etapa de número 3 ocorre a confirmação do diagnóstico do surto com base nas análises clínica e laboratorial. Em seguida, na etapa 4, são definidos e identificados os casos e, na etapa 5, são descritos os dados do surto em relação a tempo, lugar e pessoa. As próximas etapas correspondem à geração de hipóteses e à avaliação delas, bem como à realização de estudos

complementares. Todas essas etapas visam à etapa 9, em que são desenvolvidas e implementadas as medidas de controle e prevenção.

Por fim, na última etapa, a investigação é concluída, sendo emitido um relatório e comunicados os resultados. Estes devem ser divulgados em um relatório final, que deverá ser discutido com os médicos envolvidos no atendimento inicial dos doentes; com as pessoas envolvidas na gerência do local ou, no caso de o surto ter ocorrido em uma comunidade, com a liderança local; e com a população em geral, a fim de realizar ações educativas voltadas para a prevenção sanitária, a qual deve ser feita de acordo com a Política Nacional de Vigilância em Saúde (PNVS).

Sobre a PNVS, é um documento norteador do planejamento das ações de vigilância em saúde nas três esferas de gestão do SUS, caracterizado pela definição das responsabilidades, princípios, diretrizes e estratégias dessa vigilância. Ela compreende a articulação dos saberes, processos e práticas relacionados à vigilância epidemiológica, vigilância em saúde ambiental, vigilância em saúde do trabalhador e vigilância sanitária e alinha-se com o conjunto de políticas de saúde no âmbito do SUS, considerando a transversalidade das ações de vigilância em saúde sobre a determinação do processo saúde doença. Assim, é imprescindível lembrar que é necessário uma equipe multiprofissional como médicos veterinários, médicos, enfermeiros, agentes técnicos de saúde e cirurgiões-dentistas.

É importante ressaltar que conforme a Lei no 6.259, de 30 de outubro de 1975, é obrigatório que os profissionais de saúde ou responsáveis pelos serviços públicos e privados notifiquem suspeita ou confirmação de agravo à saúde em pacientes (BRASIL, 1975). Essa notificação compulsória deve ser feita às autoridades de saúde competentes dentro de 24 horas após o atendimento realizado pelo profissional. Por sua vez, na notificação imediata, comunica-se em nível local a ocorrência do surto de DTAA. Em geral, a unidade de saúde ou hospital contata o nível central, que, então, aciona os níveis seguintes para que eles deem seguimento na investigação do surto.

Para que um surto seja notificado e inserido nas estatísticas, é preciso que ele siga um fluxo de informações (Quadro 1), que deverá ser alimentado por relatórios, informes e boletins. Esses documentos devem informar os surtos que estão sendo investigados; o local onde eles ocorreram; o número de

peças envolvidas, bem como o sexo e a faixa etária delas; as hospitalizações; os óbitos; as manifestações clínicas e os agentes etiológicos envolvidos; além dos alimentos que fizeram parte do surto.

Quadro 1. Fluxo de informações e instrumentos usados para a notificação de surtos de DTAA

Nível	Atividades	Informes
Serviços de saúde, comunidade, outros ↓	Comunicado da ocorrência (por telefone, comunicação pessoal, e-mail, etc.)	
Secretarias municipais de saúde ↓	Registro de notificação de caso/surto de DTAA Usar <b>formulário 1</b> ↓ Notificar imediatamente os níveis hierárquicos superiores Usar <b>formulário 1</b> ↓ Realizar investigação epidemiológica Usar <b>formulários 2 e 3</b> (às vezes) ↓ Consolidar os dados, construir gráficos, analisar em conjunto com a equipe de investigação Usar <b>formulários 4, 7 e 8</b> ↓ Preparar relatório de investigação de surto de DTA Divulgar o relatório entre as áreas Usar <b>formulário 5</b>	
Diretorias regionais ↓	Analisar e encaminhar o <b>formulário 5</b>	↑ Informes/boletins regionais/estaduais
Secretarias estaduais de saúde ↓	Analisar e consolidar mensalmente os relatórios Encaminhar <b>formulário 5</b>	↑ Informes/boletins estaduais
Coordenação de Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (COVEH) ↓	Consolidar, analisar e divulgar os relatórios nacionais	↑ Informes/boletins nacionais
OPAS	Consolidar e analisar os relatórios internacionais	↑ Informes/boletins internacionais

Fonte: Adaptado de Brasil (1999).

Então, com o intuito de melhorar as condições sanitárias e, assim, evitar surtos de DTAA, atualmente existem no Brasil a Vigilância Sanitária e a Vigilância Epidemiológica. A Vigilância Sanitária desenvolve diferentes materiais para orientar a população e as empresas quanto às boas práticas de fabricação. Essa medida objetiva garantir a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, de modo que eles não causem danos à saúde do consumidor final. A Vigilância Epidemiológica, por sua vez, verifica notificações e investiga surtos

alimentares, proporcionando dados confiáveis para a Vigilância Sanitária, que, a partir deles, aperfeiçoa suas orientações à população e às empresas no que diz respeito à produção, à comercialização e à distribuição de alimentos.

Nesse contexto, as ações de vigilância no sistema público de saúde são de extrema importância, pois elas se relacionam diretamente com as práticas de atenção e promoção da saúde dos cidadãos. Como essas práticas incluem as estratégias para prevenção de doenças, os órgãos de vigilância sanitária, epidemiológica e ambiental se mostram importantes órgãos de fiscalização, planejamento e elaboração de políticas voltadas ao cuidado com a saúde humana.

Notificar e investigar corretamente os surtos de DTAAs são medidas importantes para fornecer subsídios para o desenvolvimento de ações que visem a corrigir falhas nos processos de produção de alimentos, bem como para a criação de ações políticas, educacionais e legislativas que reduzam os agravos à saúde gerados por essas doenças. Dentro da saúde pública, essas medidas de educação em saúde objetivam orientar sobre as práticas de higiene na produção de alimentos a população em geral e os profissionais que trabalham com alimentos em qualquer etapa.



## Referências

BERTOLINO, Marco T. Gerenciamento da Qualidade na Indústria Alimentícia. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução - RDC Nº 331, de 23 de dezembro de 2019, dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, que estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

FELLOWS, P J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. [Digite o Local da Editora]: Grupo A, 2019. *E-book*. ISBN 9788582715260. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715260/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

FOODS, International Commission On Microbiological Specifications F. **Microrganismos em alimentos**. [Digite o Local da Editora]: Editora Blucher, 2015. *E-book*. ISBN 9788521208587. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521208587/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. [Digite o Local da Editora]: Grupo A, 2013. *E-book*. ISBN 9788536327068. Disponível

em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536327068/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

GANDRA, E.A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S.. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol.**, Maringá, v. 30, n. 1, p.109-118, 2008.

GERMANO, Pedro Manuel L.; GERMANO, Maria Izabel S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos 6a ed.**. [Digite o Local da Editora]: Editora Manole, 2019. *E-book*. ISBN 9788520454176. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788520454176/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). **Microrganismos em Alimentos** [recurso eletrônico]. Editora Blucher. 536

SILVA, Neusely da; JUNQUEIRA, Valéria C A.; SILVEIRA, Neliane F. de A.; AL, et. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. [Digite o Local da Editora]: Editora Blucher, 2017. *E-book*. ISBN 9788521212263. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521212263/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

VENTURI, Ivonilce; ANNA, Lina Cláudia S.; SCHMITZ, Jeison F.; et al. **Higiene e controle sanitário de alimentos**. [Digite o Local da Editora]: Grupo A, 2021. *E-book*. ISBN 9786556901602. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786556901602/>. Acesso em: 20 jan. 2023