

**Profª: Drª Evelise Oliveira Telles**

## **TEMA 2 – MICROORGANISMOS DETERIORANTES, PATOGÊNICOS E TECNOLÓGICOS. FATORES INTRÍNSECOS E EXTRÍNSECOS.**

### **MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS**

A microbiologia dos alimentos é uma área da ciência que abrange o estudo científico dos microrganismos (bactéria, fungos, protozoários, vírus, alga), os quais podem ter tanto efeitos deletérios como benéficos na qualidade dos alimentos. Há ainda os microrganismos que podem causar danos à saúde do consumidor. Esta área visa cobrir a grande variedade de microrganismos existentes em alimentos, tantos os contaminantes quanto os deliberadamente inoculados (usados na produção dos alimentos).

A microbiologia dos alimentos foca na biologia geral dos microrganismos que são encontrados em alimentos incluindo: as características de crescimento, identificação, fisiologia, sobrevivência, patogêneses. Especificamente, as áreas de interesse que dizem respeito à microbiologia dos alimentos são doenças de origem alimentar, deterioração dos alimentos, preservação dos alimentos, e legislação dos alimentos.

### **CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS NA MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**1. MICRORGANISMOS DETERIORANTES:** Microrganismos que alteram os alimentos – os microrganismos nos alimentos são causadores de alterações químicas prejudiciais, resultando na “deterioração microbiana”. A deterioração resulta em alterações de cor, odor, sabor, textura e aspecto do alimento.

**2. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS:** Microrganismos causadores de doenças – os microrganismos nos alimentos podem apresentar risco a saúde. Os MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS podem afetar tanto o homem como os animais. As características das doenças que esses microrganismos causam dependem de uma série de fatores inerentes ao alimento, ao microrganismo em questão e ao indivíduo a ser afetado.

**3. Microrganismos que são UTILIZADOS na PRODUÇÃO de alimentos (Microrganismos tecnológicos)** – há microrganismos que realizam funções positivas em alguns ramos da indústria alimentícia, tais como produção de vinho, cerveja, produtos de panificadoras, derivados do leite etc.

### **FONTES DE CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS**

As principais fontes de contaminação são:

- |                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| a) Solo e água                | b) Plantas          |
| c) Utensílios                 | d) Trato intestinal |
| e) Manipuladores de alimentos | f) Ração animal     |
| g) Pele de animais            | h) Ar e pó          |

**MICROORGANISMOS DE INTERESSE EM ALIMENTOS****BACTERIAS****FUNGOS (Bolores e Leveduras)****VIRUS****BACTÉRIAS**

As bactérias importantes na microbiologia dos alimentos podem ser divididas em grupos de acordo com o produto da fermentação, p. ex.: bactéria ácido láctica, bactéria ácido acética, bactéria ácido propiônica. Tendo em vista o constituinte do alimento atacado (usado como alimento para microrganismos), bactéria proteolítica, bactéria sacarolítica, bactéria lipolítica pode ser distinguida.

As bactérias importantes na segurança dos alimentos são reconhecidas como microrganismos que causam deterioração e algumas patogênicas.

A classificação sistemática das bactérias é baseada primariamente nas propriedades morfológicas e fisiológicas (p.ex: bactéria aeróbia, anaeróbia, bactéria formadora de gás, GRAM +, GRAM – , etc)

**BOLORES**

A maioria dos bolores está envolvida na deterioração dos alimentos, o uso deles na indústria de alimentos é limitado (p.ex.: queijo fabricado com fungo, p. ex. Roquefort, Camembert).

**LEVEDURAS**

As leveduras são os microrganismos mais amplamente utilizados na indústria dos alimentos devido as suas habilidades em fermentarem açúcar em etanol e dióxido de carbono. Algumas variedades de leveduras, tais como fermentos de padeiro são cultivados industrialmente, e algumas podem ser usadas como fontes de proteína, principalmente na alimentação animal.

**VÍRUS**

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, isto é, para sobreviver e multiplicar é necessário que estejam parasitando uma célula hospedeira viva. Devido à característica de serem INATIVOS nos alimentos, os vírus importantes são aqueles que causam doenças no homem e nos animais.

A grande maioria dos vírus de interesse em alimentos tem estrutura icosaédrica, e todos os vírus de interesse em alimentos têm a natureza do ácido nucleico RNA, normalmente de fita simples.

As doenças virais humanas causadas pelo consumo de água e alimentos são relativamente poucas, merecendo destaque a hepatite A, poliomielite e as gastroenterites por rotavírus e por vírus Norwalk.

### **FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO MICROBIANO**

Um alimento é uma matriz quimicamente complexa e, por isso, prever como e o quão rápido os microrganismos se desenvolverão é bastante difícil. A maioria dos alimentos contém nutrientes suficientes para sustentar o crescimento microbiano. Muitos fatores podem propiciar, prevenir ou limitar o crescimento de microrganismos em alimentos, sendo que os mais importantes são Atividade de Água ( $A_w$ ), pH e temperatura.

Os fatores que afetam o desenvolvimento bacteriano são divididos em dois grupos: parâmetros intrínsecos e extrínsecos, que afetam o crescimento microbiano em alimentos.

Os parâmetros extrínsecos são aquelas propriedades do meio (processamento e armazenamento) que existem fora do alimento, que afetam ambos, os alimentos e os microrganismos que estão neles. Por outro lado, os parâmetros intrínsecos são propriedades que fazem parte do alimento, por exemplo, os tecidos são uma parte inerente do animal que, sob diversas condições, podem promover crescimento dos microrganismos.

Porém é importante ressaltar que é a inter-relação entre os fatores que irá definir se haverá ou não crescimento microbiano em determinado alimento. Frequentemente, os resultados dessas inter-relações não são previsíveis devido ao pouco conhecimento a respeito de sinergismos ou antagonismos eventuais.

- **Exemplo da importância de conhecer as inter-relações dos fatores:**

A prevenção do crescimento de *Clostridium botulinum*. Os alimentos com pH 5,0 (dentro da faixa de crescimento do *C. botulinum*) e Atividade de Água 0,935 (acima do valor mínimo para o *C. botulinum*) podem não permitir o crescimento dessa bactéria.

### **FATORES INTRÍNSECOS**

#### **➤ Atividade da água ou disponibilidade de água ou Water activity ( $A_w$ ) ou Moisture content**

Quando outras substâncias (solutos) são adicionadas à água, suas moléculas orientam-se na superfície dos solutos, e as propriedades da solução mudam drasticamente. A célula microbiana deve competir com as moléculas de soluto pela água livre. **Com exceção do *Staphylococcus aureus*, as bactérias são mais competidoras por água livre do que os fungos (Chirife & del Pilarbuera, 1996). A maioria das bactérias patogênicas requerem  $A_w$  maior do que 0,9, no entanto, *S. aureus* pode crescer em  $A_w$  tão baixa quanto 0,86.**

A atividade de água é a medida da água disponível em uma amostra.

A atividade de água é a razão entre a pressão do valor d'água da amostra e a da água pura, à mesma temperatura.

Uma solução de água pura possui valor de  $A_w$  igual a 1,00. A adição de solutos reduz o valor de  $A_w$  para menos de 1,00 (p.ex: adição de açúcar no leite diminuirá a  $A_w$ ).

A  $A_w$  varia pouco com a variação da temperatura de crescimento de microrganismos. A  $A_w$  de uma solução pode interferir no efeito do calor para matar bactérias em uma dada  $T^\circ$ . Um valor de  $A_w$  geralmente estabelece o valor mínimo em que uma bactéria pode crescer. Quando a  $A_w$  for mínima o crescimento da população bacteriana será mínimo; aumentará sempre que aumentar a  $A_w$ . Em valores mais baixos do que o mínimo, as bactérias não necessariamente morrerão, mesmo que isso aconteça a algumas porções da população. As populações que sobreviverem permanecem inativas, mas infecciosas.

Porém não é só este fator do alimento que determina o crescimento ou não da bactéria, mas sim a inter-relação entre todos os fatores.

A  $A_w$  é um fator bastante utilizado como um fator de conservação dos alimentos, por meio da adição de sal (p.ex: conservação de carnes, peixes) ou açúcar (p.ex: geleias, conservas). Exemplos de métodos mais antigos de preservação envolvendo a  $A_w$  são: secagem e dessecação.

Grupo microbiano	$A_w$ mínima
Maioria das bactérias	0,88-0,91
Maioria das leveduras	0,88
Maioria dos bolores	0,80
Bactérias halófilas <i>sal</i>	0,75
Bolores xerotolerantes <i>seco</i>	0,71
Bol. xerófilos e leveduras osmófilas <i>açúcar</i>	0,60-0,62

Existem alguns grupos de microrganismos que são particularmente resistentes à baixa  $A_w$

Valores de $A_w$	Tipos de alimentos
> 0,98	Carnes e pescados frescos, leite e outras bebidas, frutas e hortaliças frescas, hortaliças em salmoura enlatadas e frutas em calda enlatadas.
0,93 a < 0,98	Leite evaporado, concentrados de tomate, carnes e pescados curados, sucos de frutas, queijos, pão e embutidos.
0,85 a < 0,93	Leite condensado, salame, queijos duros, produtos de confeitaria, marmeladas.
0,60 a < 0,85	Geléias, farinhas, frutas secas, caramelo, goiabada, coco ralado, pescado muito salgado e extrato de carne.
< 0,60	Doces, chocolate, mel, macarrões, batatas fritas, verduras desidratadas, ovos e leite em pó.

### ➤ Potencial de Oxi-redução (Redox, Eh)

Os processos de oxidação e redução estão relacionados com a troca de elétrons entre compostos químicos. O potencial de oxi-redução pode ser definido como sendo a facilidade com que determinado substrato ganha ou perde elétrons. Quando um elemento perde elétrons, ele é dito como oxidado, e quando ele ganha elétrons, reduzido.

Quando ocorre a transferência de elétrons de um composto para outro, estabelece-se uma diferença de potencial entre os mesmos, a qual pode ser medida por instrumentos apropriados, sendo expressa em volts (V) ou milivolts (mV). Quanto mais oxidado é um composto, mais POSITIVO é seu potencial de oxi-redução, e quanto mais reduzido é um composto, mais NEGATIVO é esse potencial. O potencial de oxi-redução de um sistema é expresso pelo símbolo Eh.

Os microrganismos variam no grau de sensibilidade ao potencial de oxi-redução e podem ser dividido em grupos de acordo com o Eh requerido.

**a) Aeróbios – requerem valores de Eh positivos para multiplicação– (+ 350 a 550 mv)**

Ex: bolores, bactérias e as leveduras oxidativas, principalmente as causadoras de deterioração de alimentos (*Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* etc). Algumas bactérias patogênicas também são aeróbias (*Bacillus cereus*, por exemplo).

**b) Anaeróbios – requerem Eh negativo, baixos, normalmente inferiores a -150mV.**

Nesse grupo estão inclusas algumas bactérias patogênicas (como *Clostridium botulinum*) e bactérias deteriorantes (p.ex.: *Desulfotomaculum nigrificans*). Algumas espécies de *Clostridium* (*C. perfringens*) são aerotolerantes.

**c) Facultativos** – Multiplicam-se bem tanto em Eh (+), condição de aerobiose, como em Eh (-), condição de anaerobiose, (+100) a (- 350) mv, respectivamente. Ex: leveduras fermentativas, família Enterobacteriaceae e bacillus.

**d) Microaerófilos** – alguns microrganismos aeróbios multiplicam-se melhor em condições ligeiramente reduzidas, Eh baixo. Ex: bactérias lácticas (lactobacilos), estreptococos.

**Quanto ao Eh ideal para os fungos:** Verifica-se que os bolores importantes em alimentos são aeróbios, enquanto as leveduras de importância são aeróbias ou anaeróbias facultativas.

#### **Eh dos Alimentos:**

A determinação do Eh dos alimentos é muito difícil.

De um modo geral alimentos de origem vegetal têm valores de Eh entre +300 e +400mV (deterioração por bactérias aeróbias e bolores). As carnes em pedaços grandes têm Eh em torno de -200mV, enquanto as moídas o valor de Eh pode SUBIR para valores de até + 200mV. Os músculos dos animais, após o abate, têm Eh de +250mV, porém cerca de 30h depois esse Eh pode cair para -250mV, dando condições para a multiplicação da microbiota anaeróbia da carne. Os queijos tem valores muito variados, entre -20 à - 200mV, dependendo das condições de fabricação.

Exemplo de Potencial de Oxi-redução em alguns alimentos:

Alimento	Potencial de oxi-redução - Eh
Leite	+200 a +400
Queijo tipo Cheddar	+300 a -100
Queijo tipo suíço	-50 a -200
Carne <i>in natura</i>	-60 a -150
Carne moída	+300
Carne enlatada	-20 a -150
Suco de uva	+409
Suco de Limão	+383

➤ **pH (concentração de íon hidrogênio, acidez ou alcalinidade relativas)**

É um dos principais fatores intrínsecos capaz de determinar o crescimento, sobrevivência ou destruição dos microrganismos nele existente. Os microrganismos têm valores de pH mínimo, máximo e ótimo, no qual seu crescimento é máximo.

Verifica-se que pH em torno da neutralidade, 7,0 (6,6 – 7,5) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos. Poucos crescem abaixo do pH 4,0. As bactérias tendem a serem mais exigentes na sua relação com o pH do que os bolores e leveduras, e as bactérias patogênicas são as mais exigentes. P.ex: A maioria as carnes tem o pH final de 5,6 para cima; isso torna esses produtos susceptíveis à deterioração por bactérias bem como pelos fungos.

Saindo da faixa de pH ótimo de um microrganismo e dirigindo-se em ambas direções, estaremos diminuindo o seu crescimento.

As mudanças bruscas no pH de um alimento podem se refletir na atividade microbiana. Os alimentos fracamente tamponáveis (ou seja, que não resistem a mudanças de pH), como os vegetais, podem alterar seu pH consideravelmente. Para as carnes, o pH de um músculo de um animal descansado pode diferir bastante do pH de um animal fatigado.

**IMPORTANTE:** Um alimento pode possuir, inicialmente, um pH que impeça o seu crescimento bacteriano, mas esse valor pode ser alterado pelo metabolismo de outros microrganismos (mofos, leveduras), permitindo o crescimento bacteriano.

**Classificação dos alimentos em função do pH:**

1. Alimentos pouco ácidos → pH superior a 4,5 – nesta faixa de pH a microbiota do alimento é bastante variada, havendo condições para o desenvolvimento da maioria das bactérias inclusive as patogênicas, bolores e leveduras. P.ex.: pH neutro do albume do ovo não é um pH ideal para multiplicação da *Salmonella*.

2. Alimentos ácidos → pH entre 4,0 – 4,5. Nesta faixa a microbiota já é bem mais restrita, representada por bactérias lácticas e algumas formas esporuladas do gênero *Bacillus* e *Clostridium*

3. Alimentos muito ácidos → pH inferior a 4,5. Nesta faixa a microbiota capaz de se desenvolver é restrita, praticamente, aos bolores e leveduras além de bactérias lácteas e acéticas

**Valores de pH de alguns alimentos**

<b>Hortaliças</b>	<b>pH</b>
Brócolis	6,5
Aspargos	5,7-6,1
Couve- de-bruxelas	6,3
Batata	5,3-5,6
Cenoura	4,9-6,0
Milho	7,3
Azeitona	3,6-3,8
Tomate	4,2-4,3
<b>Frutas</b>	<b>pH</b>
Ameixa	2,8-4,6
Figo	4,6
Laranja (suco)	3,6-4,3
Maçã	2,9-3,3
Morango	3,0-3,9
Geléia de frutas	3,5
<b>Carnes</b>	<b>pH</b>
Frangos	6,3-6,4
Presunto	5,9-6,1
“Corned beef”	5,5-6,0
Salsichas Frankfurt	6,2
Bovina (moída)	5,1-6,2
<b>Pescados</b>	<b>pH</b>
Atum	5,2-6,1
Camarão	6,8-7,0
Peixe fresco (maioria)	6,6-6,8
Salmão	6,1-6,3
<b>Laticínios</b>	<b>pH</b>
Creme de Leite	6,5
Manteiga	6,1-6,4

➤ **Composição do alimento (nutrientes disponíveis)–**

Os microrganismos variam quanto às suas exigências aos fatores de crescimento e à capacidade de utilizarem os diferentes substratos que compõem os alimentos. 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, podemos determinar qual o microrganismo que terá maiores possibilidades de se desenvolver.

- Os bolores são de particular interesse na deterioração de matérias primas ricas em carboidratos complexos (polissacarídeos), como amido e celulose.
- Os óleos e gorduras sofrem a ação de muitos bolores, leveduras e algumas bactérias.

➤ **Substâncias Naturalmente Antimicrobianas –**

A estabilidade de alguns produtos de origem animal e vegetal ocorre, na natureza, devido à presença de constituintes antimicrobianos, que são substâncias naturalmente presentes nesses alimentos tendo a capacidade de retardar ou inibir a multiplicação microbiana.

Ex: Eugenol - cravo e canela; Timol e isso timol – orégano; Lisozima, coalbumina e avidina no albume do ovo impedem a multiplicação e o deslocamento bacteriano, como da *Salmonella*; Alcina – alho; Nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus lactis spp. Lactis*, sendo o seu uso em alimentos autorizado pela United States Food and Drug Administration (FDA). A nisina é efetiva para impedir o desenvolvimento de GRAM + e a germinação dos seus esporos, mas não é ativa contra GRAM -. A nisina é considerada conservador natural.

➤ **Interação entre Microrganismos (flora microbiana natural)–**

Um determinado microrganismo ao se multiplicar em um alimento produz metabólitos que podem afetar a capacidade de sobrevivência e de multiplicação de outros microrganismos presentes nesse alimento.

P.ex: Bactérias produtoras de ácido láctico podem alterar o pH do alimento de tal forma que o torna ácido demais para o crescimento de outros microrganismos. É exemplo também de interação de microrganismos a bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus lactis spp. lactis* citado anteriormente.

➤ **Estruturas Biológicas:**

A proteção natural de algumas fontes de alimentos fornece excelente proteção que impede a entrada e o subsequente estrago pelos organismos deteriorantes.

P.ex.: Couro, pele, penas dos animais.

## FATORES EXTRINSECOS

### ➤ Temperatura de Armazenamento

É um importante fator ambiental que pode afetar o crescimento microbiano.

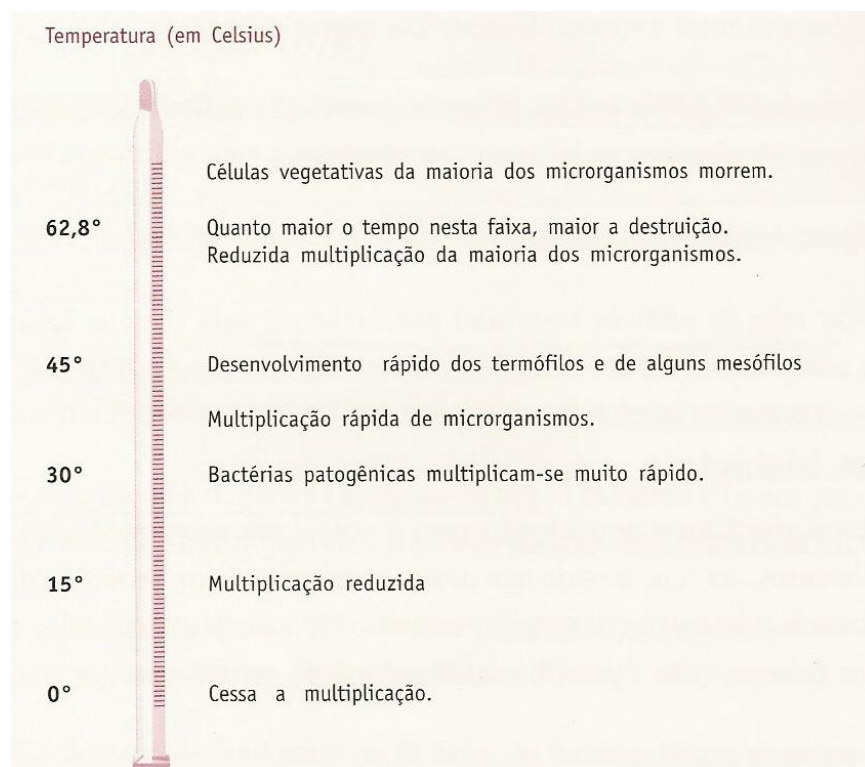
Os microrganismos, individualmente ou como grupo, crescem sob uma faixa de temperatura. As faixas de T° para o crescimento microbiano, bem como as de pH, possuem um valor mínimo e outro máximo, com um valor ótimo de temperatura para o crescimento máximo do microrganismo. O valor ótimo de T° de crescimento determina o grupo a que o microrganismo pertencerá: grupo dos termófilos, dos mesófilos (ou no subgrupo - psicrotrófico) e dos psicrófilos. Um microrganismo termófilo não se desenvolve em T° ambientes e, portanto, alimentos enlatados podem ser estocados à T° ambiente mesmo que contenham termófilos que sobreviveram a processamentos com altas temperaturas.

As orientações sobre o tempo e a T° para a maioria dos patógenos de origem alimentar de frutos do mar foram determinadas considerando o tempo total em uma dada temperatura.

O tempo e T° definidos para controlar o crescimento microbiano nos alimentos são baseados no conhecimento das taxas de crescimento dos patógenos de origem alimentar mais comuns e mostram que a zona de maior perigo microbiano tem o limite inferior de -1,5°C para controlar a *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *A. hydrophila*, e o limite superior de 53°C, o qual é o limite de crescimento do *Clostridium perfringens*, por exemplo.

A velocidade específica de desenvolvimento diminui na medida em que a temperatura se afasta da ótima, até que cessa o desenvolvimento ou ocorra a morte da célula.

Portanto, é importante saber a faixa de T° de crescimento dos microrganismos para determinar uma T° apropriada para o armazenamento do produto.



➤ **Umidade relativa do ambiente –**

Há uma relação estreita entre  $A_w$  de um alimento e a umidade relativa de equilíbrio do ambiente. Quando o alimento está em equilíbrio com a ATM, a umidade relativa (UR) é igual a  $A_w \times 100$ . Assim, alimentos conservados em ambiente com UR superior à sua  $A_w$  tenderão a absorver umidade do ambiente, causando um aumento da sua  $A_w$ . Por outro lado, os alimentos perderam água se a umidade ambiental for inferior à sua  $A_w$ , causando uma diminuição nesse valor. Essas alterações provocarão modificações na capacidade de multiplicação dos microrganismos presentes, que será determinada pela atividade de água ( $A_w$ ) final.

➤ **Composição atmosférica**

A composição gasosa do ambiente que envolve um alimento pode determinar os tipos de microrganismos que poderão predominar nele. A presença de oxigênio favorecerá a multiplicação de microrganismos aeróbios, enquanto a sua ausência causará a predominância dos anaeróbios, embora haja bastante variação na sensibilidade dos anaeróbios ao oxigênio.

Modificações na composição gasosa são capazes de causar alterações na microbiota que sobrevive ou multiplica em determinado alimento.

Atmosfera (ATM) Modificada corresponde a ambientes nos quais o oxigênio é – total ou parcialmente – substituído por outros gases, são empregadas como recurso tecnológico para aumentar a vida útil dos alimentos. Embalagens contendo diferentes combinações entre oxigênio, nitrogênio e gás carbônico são as mais empregadas industrialmente, embora outros gases possam também ser utilizados (monóxido de carbono, óxido nítrico, dióxido de enxofre). A embalagem a vácuo também é utilizada, principalmente em carnes.

O  $N_2$  não tem efeito antimicrobiano ou em alguns casos pouco efeito. Ele é usado para substituir o oxigênio.

O efeito antimicrobiano do  $CO_2$  depende de inúmeros fatores. O principal é a temperatura, quanto mais baixa for melhor o efeito do gás. A temperatura inadequada pode cancelar este ação biostática do gás. Além disso, a ação do gás depende do pH,  $A_w$  do alimento, condições metabólicas do microrganismos presentes e da concentração do gás.

Muitos países usam essa técnica (10% de  $CO_2$ ) para estocar frutas, provocando assim o retardamento da maturação e da putrefação causada por fungos.

Certos vegetais, principalmente frutas, são conservadas em atmosfera contendo ozônio. Não é recomendado o uso desse gás em alimentos com alto teor de lipídeos, pois acelera a rancificação.

## **MICRORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO**

São grupos ou espécies de microrganismos que, **quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação** de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

➤ **MICRORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL OU DA QUALIDADE HIGIENICO SANITARIO DO ALIMENTO**

O indicador **ideal** de contaminação fecal **deveria** preencher os seguintes pré- requisitos:

- Ter como habitat **exclusivo** o trato intestinal do homem e outros animais de sangue quente;
- Ocorrer em números **elevados** nas fezes;
- Apresentar **alta resistência** ao ambiente extra-intestinal;
- Ter técnicas **rápidas, simples e precisas** para sua detecção e/ou contagem.
- Estar **SEMPRE** presente quando o patógeno associado estiver;

### CONTAMINANTES EM ALIMENTOS

Segundo o *Codex Alimentarius*, “contaminantes” são substâncias que não foram intencionalmente adicionadas ao alimento. Os processos de produção de alimentos podem levar a contaminação do alimento em qualquer fase: durante a manufatura, manuseios, armazenagem, processamento ou distribuição. Os contaminantes podem também vir do ambiente. A presença de tais substâncias no alimento deve ser monitorada cuidadosamente para evitar contaminação que afete a qualidade do alimento ou torne o alimento inseguro.

Pode-se **avaliar microbiologicamente um produto sob diferentes diretrizes**, que são:

- ✓ ASPECTOS HIGIENICOS são as determinações microbianas que permitem avaliar higienicamente um produto, no que se refere à aplicação de Práticas de Higiene em toda sua cadeia de produção e exposição ao consumo. Baseia-se em determinações analíticas de contagem total de bactérias (mesófilos e/ou termófilos e/ou psicrotróficos), contagem de fungos (bolores e leveduras).
- ✓ PRESENÇA DE INDICADORES FECAIS – avalia a qualidade e a presença de contaminação fecal, direta ou indireta. Esse grupo de indicadores é composto por coliformes a 45°C, *E. coli* e o *Clostridium perfringens*.
- ✓ INDICADORES DE PROCESSAMENTO E/OU MANIPULAÇÃO – pertencem a esses indicadores vários grupos de microrganismos, na dependência do produto e respectivo processamento.
- ✓ MICRORGANISMOS ÚTEIS – são usados nos processos de transformação de matérias-primas em produtos alimentícios. São microrganismos controlados, cujo metabolismo sobre os componentes da matéria-prima em questão dá como resultado final um metabolito não tóxico, porém alimentício. São usados para a fermentação de massa de pão e similares, fabricação de cerveja, iogurte, queijos e de outros produtos designados de fermentação.
- ✓ INDICADORES DE RISCO são microrganismos que podem produzir toxina no produto, como a enterotoxina estafilocócica, ou causar uma toxi-infecção (*Bacillus cereus*, *clostridium perfringens*) ou uma infecção (*Salmonella*)
- ✓ TOXINAS BIOLÓGICAS - essa avaliação compreende toxinas de várias origens
- ✓ ASPECTOS SANITÁRIOS/MICRORGANISMOS PATOGENICOS os possíveis patógenos presentes nos alimentos são bactérias, vírus e parasitos.

## ALTERAÇÕES QUÍMICAS CAUSADAS POR MICRORGANISMOS

**Deterioração ou biodeterioração** é o desenvolvimento de microrganismos nos alimentos que pode levar a alterações em sua composição química, em suas propriedades organolépticas ou ainda na sua estrutura. Esses microrganismos deteriorantes produzem no seu crescimento compostos voláteis, os quais o olfato e o paladar humano podem detectar.

Na produção agrícola há casos mais comuns de deterioração, sendo as bactérias, fungos, roedores, insetos os grandes causadores.

As bactérias são responsáveis não apenas pela deterioração de carnes, leite e derivados, mas também pela perda de alimentos decorrente da presença de patógenos, como a *Salmonella*, que coloca em risco a saúde da população. Nesse último caso, o alimento, em sua maioria, não apresenta condições impróprias para consumo visíveis para o consumidor.

Os fungos são causadores da destruição de cereais, por exemplo.

### ➤ DETERIORAÇÃO MICROBIANA DE ALIMENTOS FRESCOS E PROCESSADOS

Os alimentos frescos e processados, exceção daqueles contidos em embalagens herméticas, estão em estreito contato com o ambiente e passíveis, portanto, de sofrer uma série de alterações por fatores de natureza física, química e biológica. Estas transformações dependem das características intrínsecas do alimento, bem como dos fatores extrínsecos do ambiente. A divisão genética dos alimentos em perecíveis, semi-perecíveis e estáveis, baseia-se em aspectos como a sua composição final e sua suscetibilidade à deterioração, bem como nas condições gerais, de processamento e armazenamento dos produtos.

Os alimentos frescos apresentam um grau de contaminação bastante variável, em função das condições de cultivo ou captura, no caso de produtos de origem animal, mas todos têm uma microbiota natural; posteriormente, com o manuseio em maior ou menor intensidade, contato com superfícies e equipamentos, transporte e armazenamento, os níveis de contaminação tendem a se acentuar, muitas vezes com a presença de microrganismos diferentes daqueles contido na microbiota natural. Nestas condições a permeabilidade do produto será maior, havendo até riscos quanto ao aspecto higiênico-sanitário e de saúde pública pela contaminação por microrganismos patogênicos.

As principais alterações dos alimentos frescos podem ocorrer devido ao crescimento e metabolismo bacteriano, resultado em possíveis alterações do pH e formação de compostos tóxicos, odores desagradáveis e formação de gás e camadas limosas. A oxidação de lipídeos e pigmentos contidos em alimentos gordurosos, resultado na liberação de sabor indesejável e na formação de compostos que possuem efeitos biológicos adversos ou que favoreçam a descoloração.

### ➤ MICRORGANISMOS DETERIORANTES GRAM (-)

*Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas spp* etc deterioram produtos lácteos, carne vermelha, carne de galinha, peixe, ovos durante a estocagem a frio. Esses alimentos possuem Aw alta e pH neutros. Existem diversos mecanismos de deterioração, incluindo a produção de proteases e lipases termoestáveis (p.ex: no leite elas produzem aromas e sabores desagradáveis, mesmo se o microrganismo morreu na pasteurização).

➤ **MICRORGANISMOS DETERIORANTES GRAM (+) NÃO FORMADORES DE ESPOROS**

As bactérias ácido-láticas e as *Brocothrix thermosphacta* são bastonetes GRAM + que causam deteriorações típicas em carnes estocadas em embalagens com ATM modificada ou embalagens a vácuo. A produção de diacetil causa deterioração de cervejas.

➤ **MICRORGANISMOS DETERIORANTES GRAM (+) FORMADORES DE ESPOROS**

Os microrganismos formadores de esporos tais como o *Bacillus spp.* e o *Clostridium spp.* podem ser importantes deteriorantes de alimentos processados termicamente, uma vez que esses esporos podem sobreviver ao processamento.

P. ex.: O *Bacillus cereus* pode crescer em leite pasteurizado a 5°C e produzir o coalho doce (coagulação da renina, sem acidificação) e a nata fina.

Em alimentos enlatados podem crescer o *B. stearothermophilus* causa a deterioração “ácida SEM estofamento” (*flat sour*). Por outro lado, o *Cl. Thermosaccharolyticum* deteriora alimentos enlatados, produzindo gases e, por isso, a lata ESTUFA.

O *B. stearothermophilus*, por exemplo, é um termófilico. Ele só pode crescer em temperaturas maiores do que a do ambiente. Dessa forma, alimentos enlatados são processados para estar comercialmente estéreis, uma vez que, sob condições normais de estocagem, não se espera que ocorra nenhum crescimento microbiano.

➤ **DETERIORAÇÃO PROVOCADA POR LEVEDURAS**

As leveduras são resistentes a baixas Aw e pH ácidos, mais do que as bactérias. As leveduras são microrganismos de alta importância na conservação dos alimentos.

A origem de ocorrência de espécies patogênicas em alimento é desconhecida, sua importância reside em serem eventuais agentes de deterioração em alimentos os quais apresentam condições ótimas de desenvolvimento.

É interessante observar que, dependendo do tipo de alimento e suas características básicas, uma mesma espécie de levedura pode ser benéfica ao processo tecnológico (produção de etanol, cerveja, vinhos) e em outro produto, pode se constituir em agente de deterioração (sucos de frutas) – ***Saccharomyces* são leveduras osmofílicas capazes de crescer em altas concentrações de açúcar e deterioram geleias, xaropes, mel.**

➤ **DETERIORAÇÃO PROVOCADA POR BOLORES**

Os bolores podem estragar os alimentos e ainda serem patogênicos.

A maioria dos bolores requer menor umidade (atividade de água) do que bactéria e leveduras. Por isso deterioram alimentos como vegetais e produtos de panificação.

Os bolores diferem consideravelmente entre eles no que diz respeito à atividade de água ótima e faixa de atividade de água para a germinação dos esporos. A Aw mínima de água para a germinação dos esporos pode ser tão baixa quanto 0,62 para alguns bolores e tão alta quanto 0,93 para outros.

A maioria dos bolores cresce bem sob temperatura ambiente e são classificados como mesófilos. A T<sup>o</sup>ótima para a maioria dos bolores está entre 25-30°C. No entanto, muitos bolores podem crescer sob temperaturas de refrigeração, outros ainda conseguem crescer lentamente à T<sup>o</sup> abaixo de 0°C (p.ex: *Penicillium expansum*, patógeno psicrotrófico, que age em frutas frescas e produz micotoxina denominada de patulina, muito tóxica).

Os bolores revelam notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis pH 2,0 a 9,0, porém alguns preferem alimentos ácidos tais como a maioria das frutas.

São pouco exigentes quanto aos nutrientes disponíveis (seu crescimento pode ocorrer em qualquer alimento **desde que tenha oxigênio**). O conceito de deterioração fúngica dos alimentos esta normalmente associada ao crescimento visível de colônias na superfície. E às vezes na elaboração de micotoxinas, o que torna importante o controle da proliferação dos bolores nos alimentos.

Os bolores causam sensíveis perdas ou redução nas produções de frutas hortaliças e cereais; comprometendo a qualidade dos produtos industrializados provenientes destas matérias-primas.

#### EXEMPLOS DE FUNGOS DE IMPORTÂNCIA NOS ALIMENTOS:

**Gênero *Aspergillus*:** Os membros desse gênero muito vastos. Muitos estão envolvidos na deterioração de alimentos, como nas geleias, frutas, presunto curado, vegetais, ração de animais etc

As micotoxinas (metabólito secundário produzido no final da fase exponencial de crescimento – fase log) delas podem causar doenças nos animais e humanos. P.ex.: *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* podem produzir toxinas denominadas aflatoxinas, que em humanos pode causar câncer de fígado.

**Gênero *Penicillium*:** Os membros desse gênero também são muito vastos e importantes em alimentos. Eles podem ser utilizados na maturação de queijos, como o queijo Camembert (o *Penicillium camemberti*), porém algumas espécies são deteriorantes e podem apodrecer frutas frescas, como o *Penicillium expansum* que pode produzir a micotoxina Patulina, muito tóxica.

**Gênero *Mucor*, *Rhizopus* e *Thamnidium*** – deterioram carnes.

### ➤ DETERIORAÇÃO PROVOCADA POR ENZIMAS

Ao lado das atividades bacterianas e, concomitantemente a ela, existe um fator tão importante quanto a bacteriológica na tecnologia dos alimentos, é a atividade enzimática ou diástases, que são proteínas de origem orgânica, sem vida própria e que agem como catalizadores. As enzimas são produzidas principalmente por bactérias e glândulas de secreção de seres superiores e sua ação é específica para cada tipo de reação.

### ➤ DETERIORAÇÃO MICROBIANA DE ALIMENTOS ENLATADOS E ENVASADOS

Os alimentos enlatados ou envasados normalmente são preservados pela aplicação de métodos físicos ou químicos, sendo o mais freqüente a utilização de tratamentos térmicos, de intensidade variável, de acordo com as condições do produto.

Um alimento enlatado esta comercialmente estéril quando não apresenta microrganismos capazes de deteriorar o produto. Assim, por esterilidade comercial, não se subentende esterilidade absoluta, uma vez que células viáveis podem ser recuperadas de alimento comercialmente esteireis.

Um alimento enlatado pode sofrer alterações por causa variadas:

a) Problemas de natureza microbiológica, que envolvem **sub-processamento** térmico, **resfriamento inadequado** das latas após a esterilização comercial, re-contaminação dos alimentos **por vazamento das latas e deterioração pré-processamento** térmico.

b) Problemas químicos, particularmente a corrosão interna das latas, com liberação de hidrogênio e conseqüente estufamento das mesmas.

- c) Problemas físicos, destacando-se o enchimento excessivo das latas, com ausência ou inadequação do espaço livre, exaustão deficiente, operação incorreta, com conseqüente abaulamento na lata.

Os gêneros de microrganismos envolvidos na deterioração de enlatados dependerão, principalmente do pH dos alimentos.

### ➤ DETERIORAÇÃO POR MICRORGANISMOS DOS ALIMENTOS

#### CARNE IN-NATURA –

A carne, por si só, é estéril quando no corpo do animal. Mas ela pode ser contaminada durante o abate, evisceração, manipulação no processamento e a estocagem inapropriada.

As espécies mais comuns na contaminação da carne são: ***Pseudomonas*; *Brochothrix thermosphacta*, bactérias ácido-láticas, *Staphylococcus*; *Microrcoccus*; *Enterococcus*** e as leveduras. Quanto aos patógenos, as principais bactérias encontradas na carne são: ***Salmonella sp*; *E. coli* patogênica; *Yersinia enterocolítica* e *Clostridium perfringens*.**

#### PESCADO –

A microbiota inicial dos pescados é influenciada por vários fatores relacionados ao seu habitat, como a qualidade da água, sazonalidade, temperatura, presença de poluentes e condições de captura, armazenamento, manipulação e conservação.

A microbiota do pescado é encontrada no intestino, guelras e superfície corporal. Em pescados sadios, os tecidos e órgãos internos são estéreis.

As bactérias podem ser detectadas em peixe fresco pela formação de uma camada limosa na pele, brânquias, intestinos.

Os principais gêneros bacterianos que compõem a microbiota normal do pescado são ***Pseudomonas*; *Moraxella*; *Acinetobacter*; *Vibrio*; *Bacillus*; *Sarcina serrtia*; *Clostridium*; *Alcaligenes*.** Em peixes de água doce além desses, são encontrados também os gêneros ***Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Aeromonas*.**

#### AVES –

Os principais contaminantes das aves são as ***Pseudomonas spp*, *Acinetobacter-Moraxella spp*, *Lactobacillus spp* etc** Os patógenos *Clostridium jejuni* podem estar presentes na pele e serem transferidos para as superfícies de trabalho. Os patógenos como *Salmonella enteritidis* podem infectar os ovários e ovidutos de galinhas, e conseqüentemente os ovos.

#### FRUTAS E VEGETAIS –

A microbiota inicial pode variar consideravelmente dependendo do tipo dos fatores ambientais, sazonalidade, etc, sendo constituída de microrganismos oriundos da água do solo, dos insetos e dos animais.

A maioria dos microrganismos presentes nos vegetais são saprófitas, incluindo bactérias, leveduras e bolores. Os fungos, frequentemente estão presentes em menor número que as bactérias. **Nas frutas a deterioração é causada mais por fungos do que por bactérias.** O pH das frutas inibe o crescimento da maioria das bactérias.

Patógenos – em regiões onde são utilizados dejetos de animais como fertilizantes ou água contaminada para irrigação o produto pode conter patógenos intestinais como ***Salmonella*; *Shigella*, vírus da hepatite; *E. coli*; parasitos humanos como *Giárdia lambia*; *Taenia solium*; *Ascaris lumbricoides*; *Entamoeba histolytica*, etc.**

### OVOS –

Recentemente postos, são isentos de microrganismos, seu conteúdo microbiano no subsequente é determinado pelas condições sanitárias sob as quais são manipulados, assim como pelas condições de armazenamento, temperatura e umidade. Bactérias e leveduras podem entrar no ovo através de rachaduras na casca.

Os ovos possuem barreira de fatores antimicrobianos, incluindo quelantes de ferro (conalbumina) e lisozima na albumina (clara de ovos).

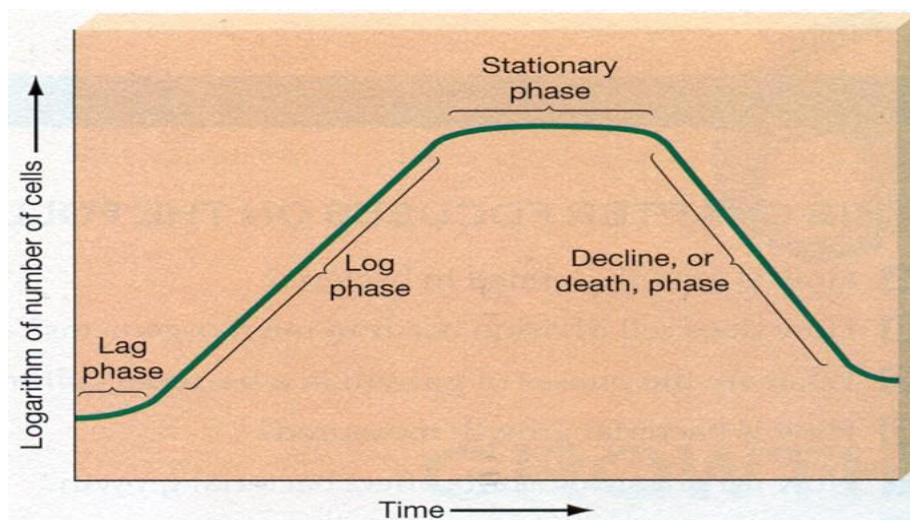
A deterioração ocorre principalmente devido a microrganismos como *Pseudomonas spp*, *Proteus vulgaris*, *Alteromonas spp*, *Serratia marcescens*.

## CICLO DE CRESCIMENTO MICROBIANO

O ciclo de crescimento microbiano é composto por 6 fases.

A **figura 1.**, abaixo, representa a curva de crescimento microbiano.

**Figura 1.** Curva de crescimento microbiano



#### 1) FASE LAG

As células não estão se multiplicando, mas sintetizando as enzimas apropriadas para o ambiente.

#### 2) FASE DE ACELERAÇÃO

Uma proporção crescente de células está se multiplicando.

#### 3) FASE EXPONENCIAL (ou log)

A população está duplicando (1-2-4-8-16-32-64 etc). O número de células cresce de maneira tal que, para visualização gráfica, melhor seria utilizar valores exponenciais (LOGARÍTMICOS). Como resultado, tem-se uma linha reta cuja inclinação representa o  $\mu_{\text{máx}}$  (taxa de crescimento máximo) e o tempo de duplicação  $t_d$  (tempo necessário para a massa celular aumentar 2 vezes).

Fase Exponencial – ocorre uma multiplicação em ritmo contínuo, podendo ser avaliada pela seguinte equação:

$$N_t = N_0 \cdot 2^n, \text{ onde}$$

$N_t$  → número de microrganismos após o tempo  $t$  de crescimento

$N_0$  → número inicial de microrganismos

$n$  → número de gerações

O valor de  $n$  pode ser calculado pela seguinte formula:  $n = t/t_g$ , onde

$t$  → é o tempo em minutos

$t_g$  → é o tempo de geração, ou tempo necessário para dobrar o número de células.

O tempo de geração varia de acordo com o microrganismo e, para um mesmo microrganismo o tempo varia de acordo com as condições ambientais (temperatura; umidade; nutrientes e necessidade de oxigênio).

#### **4) FASE DE DESACELERAÇÃO**

Uma crescente proporção de células não está mais se multiplicando.

#### **5) FASE ESTACIONÁRIA**

A taxa de nascimento é igual à de morte, resultando em um número igual de células em um dado tempo. A morte é causada pelo esgotamento de nutrientes, pela acumulação de produtos finais tóxicos e/ou outras mudanças no ambiente, tais como variações de pH. A duração da fase estacionária depende de fatores como o organismo e as condições ambientais ( $T^\circ$  etc). Os organismos esporulados formarão esporos devido a condições de estresse.

#### **6) FASE DA MORTE**

O número de células morrendo é maior do que o de células nascendo. As células que formam esporos sobreviverão mais tempo do que as que não formam.

### **CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO MICROBIANO NOS ALIMENTOS**

Uma das principais preocupações da microbiologia dos alimentos está relacionada ao controle de desenvolvimento microbiano, visando eliminar risco à saúde do consumidor, bem como prevenir ou retardar o surgimento de alterações indesejáveis nos alimentos.

Existem diversas maneiras para que esse controle seja exercido:

- 1) Uso de métodos mecânicos para remoção dos microrganismos presentes (filtração, por exemplo);
- 2) Manutenção de condições atmosféricas desfavoráveis à multiplicação microbiana (embalagem a vácuo, por exemplo).
- 3) Uso de temperaturas elevadas;
- 4) Uso de baixas temperaturas;
- 5) Desidratação;
- 6) Uso de conservadores químicos;
- 7) Irradiação do alimento;
- 8) Destruição mecânica dos microrganismos (altas pressões, por exemplo)
- 9) Combinação de 2 ou mais dos métodos citados (a mais empregada geralmente).

**Os seguintes princípios estão envolvidos na conservação dos alimentos:**

1) Prevenção ou retardamento da decomposição microbiana: É realizado impedindo-se o acesso de microrganismos aos alimentos impedindo-se o crescimento e a atividade dos microrganismos presentes (baixas temperaturas, desidratação, condições anaeróbicas ou agentes químicos) e por meio da destruição dos microrganismos (calor ou radiação);

2) Prevenção ou retardamento da autodecomposição do alimento: É realizada por meio da destruição ou inativação das enzimas do alimento (por exemplo, branqueamento), por meio da prevenção ou retardamento de reações químicas (por exemplo, prevenção da oxidação lipídica, por meio do emprego de antioxidante)

3) Prevenção de injúrias provocadas por insetos, outros animais, causas mecânicas etc