
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL E SOCIOECONOMIA RURAL

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

***Prof. Dr.:* OCTÁVIO ANTÔNIO VALSECHI.**

ARARAS, SP

2006

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Capítulo 1 : Alimentos e Microrganismos

- a. Os alimentos como substratos dos microrganismos
- b. Fatores Intrínsecos
- c. Fatores Extrínsecos
- d. Classificação dos alimentos pela facilidade com que se alteram
- e. Modificação química causada pelos microrganismos
- f. Microrganismos importantes na Microbiologia de Alimentos

Capítulo 2 : Conservação dos Alimentos

- a. Grupos de alimentos
- b. Princípios em que se baseia a conservação de alimentos
- c. Métodos de conservação de alimentos

Capítulo 3 : Alimentos e Doenças

- a. Doenças humanas transmitidas pelos alimentos e pela água
- b. Intoxicações e Infecções de origem bacteriana
- c. Intoxicações e Infecções de natureza não bacteriana
- d. Medidas gerais para o controle das doenças
- e. Psicotróficos associados a deterioração de alimentos refrigerados e congelados

Capítulo 4 : Alimentos e enzimas produzidos por microrganismos

- a. Aplicações Biotecnológicas de microrganismos
- b. Produção e cultivo para fermentação de alimentos
- c. Ingredientes de Alimentos microbianos
- d. Produção de biomassa microbiana
- e. Produção de Inseticida Microbiano
- f. Produção de Vacinas bacterianas
- g. Produção de Antibióticos
- h. Produção de etanol
- i. Produção de ácidos orgânicos : acético, cítrico, láctico, propiônico
- j. Produção de aminoácidos
- k. Produção de enzimas
- l. Bioconversões e Biotransformações
- m. Fungos de interesse industrial

Capítulo 5 : Sanitificação, controle e inspeção de alimentos

- a. Principais reações químicas para remoção de resíduos
- b. Bacteriologia da Água
- c. Principais tipos de superfícies usadas na indústria de alimentos
- d. Tipos e níveis de contaminação microbiológica
- e. Tipos de resíduos da indústria de alimentos
- f. Microbiologia dos produtos alimentícios
- g. Análise de Risco e controle de pontos críticos - HACCP

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

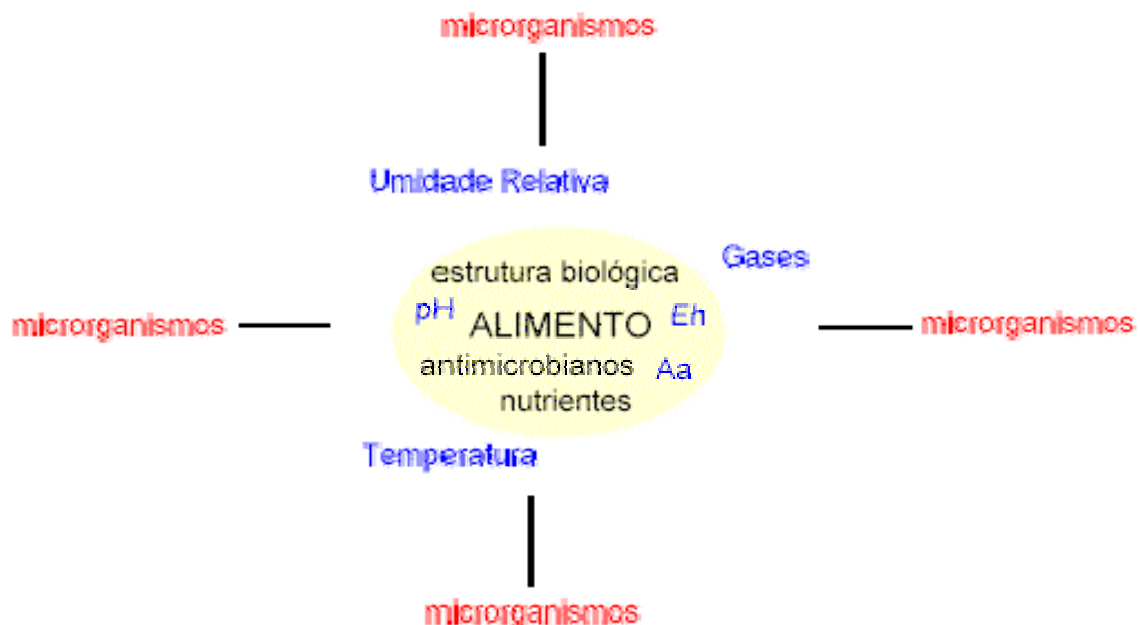
CAPÍTULO 1: Alimentos e Microrganismos

Os alimentos como substratos dos microrganismos

Todos os alimentos apresentam uma microbiota natural extremamente variável, concentrada principalmente na região superficial, embora os tecidos internos, possam eventualmente apresentarem formas microbianas viáveis - **Fatores Intrínsecos**

Ao lado da microbiota natural, nas diversas etapas que levam à obtenção de produtos processados, os alimentos estarão sujeitos à contaminação por diferentes microrganismos, provenientes de manipulação inadequada; contato com equipamentos, superfícies e utensílios; e pela atmosfera ambiental - **Fatores Extrínsecos**

A definição das espécies ou grupos de microrganismos predominante no alimento irá depender, fundamentalmente, das características inerentes a esse alimento, e por isso FATORES INTRÍNSECOS dos alimentos, bem como das condições ambientais prevalentes e portanto FATORES EXTRÍNSECOS



As bactérias, bolores e leveduras são os microrganismos de maior destaque como agentes potenciais de deterioração e como eventuais patógenos ao homem. Na grande maioria das situações, as bactérias são os microrganismos numericamente predominantes nos alimentos, principalmente por :

- apresentarem um tempo de geração bastante reduzido
- serem capazes de utilizar uma diversidade de substratos
- apresentarem ampla variação de comportamento dos diferentes gêneros frente a fatores ambientais

O conhecimento dos fatores (intrínsecos e extrínsecos) que favorecem ou inibem a multiplicação dos microrganismos é essencial para compreender os princípios básicos que regem tanto a alteração como a conservação dos alimentos :

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Fatores Intrínsecos :

1. Atividade da água - Aa

O crescimento e o metabolismo microbiano exigem a presença de **água numa forma disponível** e a Aa é um índice desta disponibilidade para utilização em reações químicas e crescimento microbiano

$$Aa = \frac{P}{P_0} = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

P = pressão de vapor da solução (solútils em água)

P_0 = pressão de vapor do solvente puro

n_1 = número de moles do soluto

n_2 = número de moles do solvente

A adição de solutos a um líquido puro irá causar uma redução na pressão de vapor da solução e conseqüentemente diminuir a Aa. Sendo 1 o valor de Aa obtido na água pura, os valores de Aa oscilarão entre 0 e 1

Exemplo 1	Aa = 0.995 - um meio com 0.88% de NaCl; 8,52% de sacarose; e 4,45% de glicose
Exemplo 2	Aa = 0.860 - um meio com 18.18% de NaCl; 68,60% de sacarose; e 58,45% de glicose

Os fatores no alimento capazes de reduzir a pressão de vapor da água, e conseqüentemente a Aa são principalmente:

- 1.adsorção de moléculas de água em superfície
- 2.forças capilares
- 3.formação de soluções com diferentes solutos
- 4.formação de colóides hidrófilos
- 5.presença de água de cristalização ou hidratação

Exemplo : Glicerol (diminui a Aa), utilizado em meios de cultivo para inibir o crescimento de microrganismos muito sensíveis à Aa, como por exemplo as bactérias (a maioria não cresce com Aa inferior a 0.91)

Valores mínimos de Aa que permite a multiplicação de microrganismos que alteram os alimentos

Grupo de microrganismos	Valor mínimo de Aa
Maioria das bactérias	0.91
Maioria das leveduras	0.88
Maioria dos mofo	0.80
Bactérias halofílicas	0.75
Fungos xerofílicos	0.65
Leveduras osmofílicas	0.60

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Principais grupos de alimentos e seus valores de Aa

Aa = 0.98 e superiores => carne e pescado frescos; frutas e hortaliças frescas; leite e a maioria das bebidas; hortaliças; enlatadas em salmoura; frutas enlatadas em pouca concentração de açúcar

Aa = 0.93 - 0.98 => pasta de tomate; queijo submetido a tratamento industrial; carnes curadas enlatadas; embutidos; fermentados (não dessecados); frutas enlatadas em alta concentração de açúcar

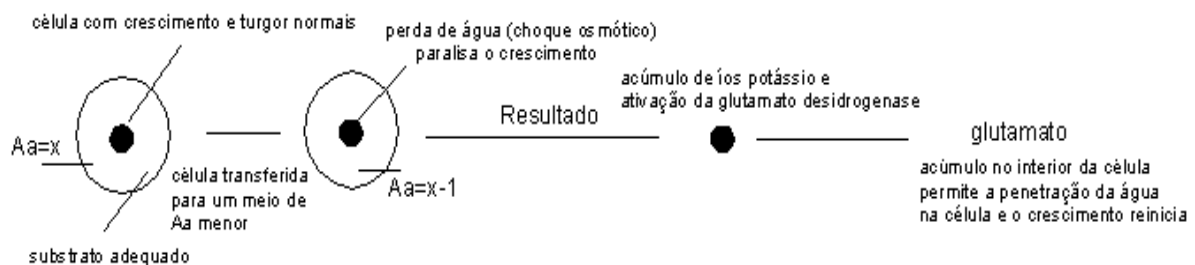
Aa = 0.85 - 0.93 => embutidos secos e fermentados; presunto fresco; queijo de cheddar velho; leite condensado

Aa = 0.60 - 0.85 => frutas dessecadas; farinha; cereais; compotas e geléias; nozes; alimento de umidade intermédia

Aa = Inferiores a 0.60 => chocolate; pastelaria; mel; biscoito; bolachas cream cracker; batata inglesa; ovos e hortaliças; desidratados e leite em pó

O acúmulo de glutamato implica, em determinado tempo, numa grande quantidade de cargas negativas, o que necessita ser contrabalanceado com a presença de um cátion. O próprio potássio se responsabiliza, porém em valores de Aa próximos a 0.95 a concentração de cátion passa a ser tóxica e o crescimento é interrompido.

Os mecanismos que podem explicar a atividade microbiana em valores de Aa inferior a 0.95 podem ser (1) a descarboxilação do glutamato a ácido gama-aminobutílico-GABA; (2) redução do glutamato a prolina. Estes dois aminoácidos (GABA e prolina) são pouco ionizados não havendo portanto necessidade de acúmulo paralelo de íons potássio.



Meios usados para reduzir Aa no meio de cultura:

1. Malt Salt Agar - meio muito escuro que impede a visualização das colônias
2. Meio com alta concentração de açúcar - ocorre cristalização, que impede o repique
3. Glicerol - o mais recomendado, pois além de não ser escuro, e não cristalizar, não afeta a atividade enzimática do microrganismo, reduz o tamanho da colônia e reduz o espalhamento no meio das hifas dos bolores.

A determinação da Aa pode ser feita por :

1. higrômetros elétricos

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

2. interpolação gráfica - amostras de alimentos são mantidas em temperatura constante no interior de dessecadores, contendo soluções saturadas de diferentes sais, que permitem a obtenção de ambientes com umidades relativas constantes. As amostras são pesadas em diferentes intervalos de tempo, registrada no gráfico, em relação às várias Aa em estudo. Quando não mais houver variação de peso da amostra, então este ponto corresponde à sua Aa

2. Potencial Hidrogeniônico - pH

$\text{pH} = -\log \{H^+\}$; Quanto $> H^+ < \text{pH}$, e conseqüentemente mais ácido o alimento

pH > 4.5 Alimentos de baixa acidez	predominância de crescimento bacteriano - em face do menor tempo de geração (patógenos, esporângicas ou não, aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termófilos)
pH entre 4.5 e 4.0 Alimentos ácidos	predominância de leveduras oxidativas ou fermentativas e de bolores (em aerobiose). Algumas bactérias esporogênicas e não esporogênicas.
pH < 4.0 Alimentos muito ácidos	fica restrito a quase que exclusivamente às leveduras e bolores. Bactérias acéticas, e <i>Zymomonas</i> (esta até pH 3.7)

Os diferentes ácidos podem exercer um efeito inibitório ou letal sobre a célula microbiana, pela concentração hidrogeniônica (nível de H^+ livre) ou pela toxicidade do ácido não dissociado

O pH intracelular (em condições normais em torno de 7.0) é bastante afetado pelas variações externas. A acidificação no interior da célula pode ser devido:

- a migração dos íons H^+ do meio externo para o meio interno
- dissociação das moléculas dos ácidos que penetram através da membrana
- ácidos orgânicos fracos na forma não dissociada, os quais são facilmente solúveis na membrana celular, interferindo assim na sua permeabilidade, o que leva a afetar o transporte de substrato e a fosforilação oxidativa, inibindo o transporte de elétrons e causando a acidificação do interior da célula
- alguns ácidos ao se dissociarem liberam ânions que podem ser metabolizados e alguns tem atividade inibitória

Determinados alimentos são mais resistentes à mudança de pH que outros, são os chamados **alimentos tamponados**. As carnes apresentam maior capacidade tamponada que as verduras e hortaliças

3. Potencial de Oxido-Redução - Eh

É uma medida da tendência de um sistema reversível de doar e receber elétrons. Mede a facilidade com que o substrato capta ou cede elétrons.

oxidação - liberação ou perda de elétrons

redução - o composto recebe elétrons

Equação de Nernst :

$$Eh = Eo + 0.06/n \log (ox)/(red) \text{ onde}$$

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

E_o = padrão redox (pH=0)

n = número de elétrons envolvidos no processo

(ox) (red) = concentração no estado oxidado e reduzido

Quanto menor E_h maior será a capacidade de ceder elétrons. A determinação do E_h é feita por potenciômetros.

Microrganismos	E_h de crescimento (em mV)
Aeróbios	+ 350 a + 500
Anaeróbios	+ 30 a - 250 (melhor = -150) na ausência de O_2 toleram substrato com E_h elevado (+ 370) na presença de O_2 este limite cai para + 100
Anaeróbios Facultativos	+ 100 a + 350

A presença de O_2 para os anaeróbios é mais letal do que o potencial positivo de oxirredução - isto pode ser explicado pelo fato deste grupo não ser capaz de produzir a enzima catalase, que decompõe a água oxigenada (H_2O_2) em H_2O e O_2 ; e o acúmulo deste composto intoxica a célula

Fatores Extrínsecos:

1. Temperatura

O crescimento microbiano apresenta uma faixa muito ampla de temperaturas (- 8° a - 90° C). A temperatura exerce uma influência marcante nas características :

- (1) duração da fase lag
- (2) velocidade de crescimento
- (3) o número final de células de uma população
- (4) na composição química e enzimática da célula

Grupos de microrganismos baseados no seu ótimo de temperatura para o crescimento

Microrganismos	Temperatura (°C)
Termófilos	55-75
Mesófilos	30-45
Psicrotrófilos	25-30
Psicrófilos	12-15

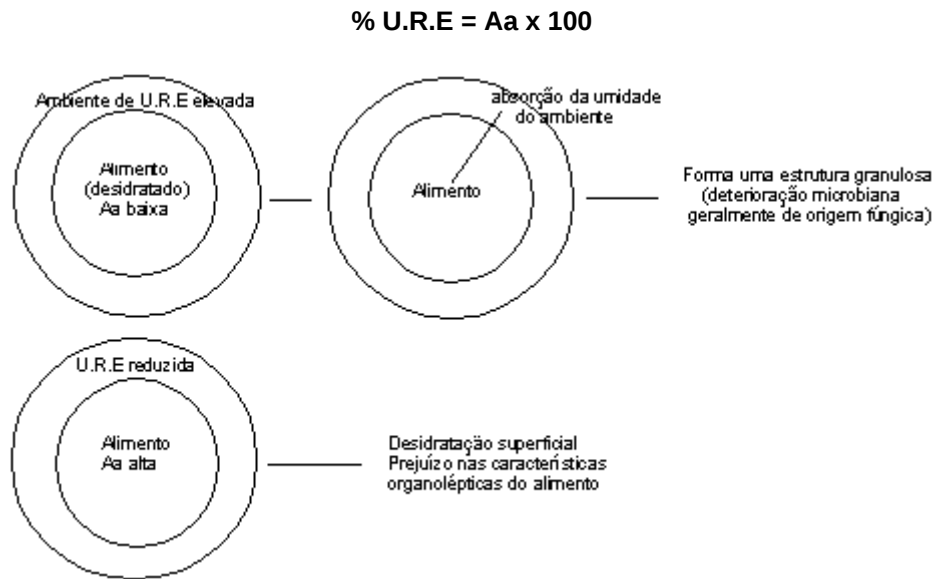
- os psicrotrófilos são de extrema importância como agentes deterioradores de alimento (*Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Vibrio*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, etc)
- a maior parte das bactérias termófilas de importância alimentícia estão incluídas no gênero *Bacillus* e *Clostridium*, porém poucas são as espécies termófilas destes

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- entre os mesófilos destacam-se as bactérias patogênicas e deterioradoras, alguns bolores e leveduras
- os psicrófilos estritos ocorrem mais em ambientes marinhos e em locais que a temperatura permanece constantemente reduzida

2. Umidade Relativa do Ambiente - U.R.E

A U.R.E está envolvida na maior ou menor perecibilidade de um alimento. Há uma estreita relação entre a U.R.E e a Aa :



O relacionamento Aa/U.R.E deve ser levado em conta para melhor adequar as condições de embalagem dos produtos alimentícios e de garantir o controle do desenvolvimento microbiano - maior prolongando o tempo de armazenagem.

3. Atmosfera envolvendo o alimento - presença e concentração de gases no meio ambiente

O uso de atmosfera controlada envolvendo os alimentos poderá modificar a natureza do processo de deterioração, podendo retardá-lo, como por exemplo, a presença de O₂ para os anaeróbios

O CO₂ é o gás mais utilizado para retardar a deterioração de alimentos (frutas, produtos cárneos). A maioria das bactérias, bolores e leveduras são inibidas, mas não destruídos em atmosfera contendo 5 e 50 % de CO₂ (v/v). Uma concentração de 10%, reduz em até 50% nas contagens totais

O CO₂ é muito eficiente contra microrganismos psicrotrófilos - bolores e leveduras oxidativas e bactérias Gram-negativas. O emprego de 15% de CO₂ na atmosfera praticamente dobra o espaço de tempo para estas bactérias se multiplicarem a 0 °C

As bactérias Gram-Positivas, principalmente as lácticas, são resistentes ao CO₂

Classificação dos Alimentos pela facilidade com que se alteram

1. Alimentos estáveis ou não perecíveis - não são alterados facilmente (açúcar, farinha)
2. Alimentos semiperecíveis - conservando e manipulando de forma apropriada permanecem sem alteração (batatas, maçãs, nabos, nozes sem casca)

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

3. Alimentos perecíveis - incluem os alimentos mais importantes do consumo cotidiano, os quais se alteram com facilidade (carnes, pescados, a maioria das frutas, hortaliças, ovos, leite)

Modificação química causada pelos microrganismos

Dos compostos Nitrogenados :

- a maior parte do N contido nos alimentos se encontram formando parte das proteínas, e estas para serem usadas como fonte de Nitrogênio pelos microrganismos deverá ser quebrada (pelas enzimas microbianas, ou aquelas contidas no próprio alimento) a substâncias mais simples como peptídeos e aminoácidos
- os peptídeos têm sabor amargo (mais não desagradável) que modifica o sabor do alimento
- a decomposição de polipeptídeos e aminoácidos (em anaerobiose) forma compostos sulfurados de odor desagradável (putrefação), como sulfetos de hidrogênio, metil, etil mercaptano, além de amoníaco e aminas. Quando os microrganismos atuam sobre os aminoácidos podem desaminá-los e/ou descarboxilá-los

Reações Químicas	Produtos Formados
Desaminação Oxidativa	cetoácidos + NH_3
Desaminação Hidrolítica	hidroxiácido + NH_3
Desaminação Redutora	ácido graxo saturado + NH_3
Desnaturação e Desaminação	ácido graxo não saturado + NH_3
Oxidação-Redução	cetoácido + ácido graxo + NH_3
Descarboxilação	amida + CO_2
Desaminação Hidrolítica + Descarboxilação	álcool primário + NH_3 + CO_2
Desaminação Redutora + Descarboxilação	hidrocarbono + NH_3 + CO_2
Desaminação Oxidativa + Descarboxilação	ácido graxo + NH_3 + CO_2

Dos compostos não Nitrogenados :

Usados pelos microrganismos principalmente para obter energia - hidratos de carbono, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas, álcoois, glicosídeos, compostos cíclicos e lipídeos

Hidratos de Carbono

- são os preferidos dos microrganismos caso o alimento os contém. Os poli, tri, e dissacarídeos devem ser hidrolisados (por enzimas) a substâncias mais simples (monossacarídeos)
- o monossacarídeo **glicose** quando usado em :

(1) aerobiose - é oxidada a CO_2 + H_2O

(2) anaerobiose - diferentes produtos podem ser formados dependendo da via seguida

fermentação alcoólica (por leveduras) - álcool + CO_2

fermentação láctica (por bactérias lácticas homofermentativas) - ácido láctico

fermentação láctica mista (por bactérias lácticas heterofermentativas) - ácido láctico, ácido acético, etanol, glicerol e água

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

fermentação do tipo coliforme (bactérias coliformes) - ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, etanol, acetona, butanodiol, H₂, CO₂

fermentação propiônica (bactérias propiônicas) - ácidos propiônico, succínico, e acético; e CO₂

fermentação butírica-butil-iso-propílica (bactérias anaeróbicas) - ácidos butírico e acético, hidrogênio, acetona, butilenoglicol, butanol, propanol-2, CO₂

- quando se encontram em atividade diferentes microrganismos, a partir dos açúcares, pode originar outros compostos distintos, como ácidos graxos superiores, outros ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas, ésteres, etc.

Microrganismos importantes na microbiologia de alimentos

Microrganismos causadores de doenças ao homem e/ou animal

1. Doenças Zoonóticas (entre animais vertebrados e o homem) e o agente causador

antraz - *Bacillus anthracis*

tuberculose - *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*

listerose - *Listeria monocytogenes*

brucelose - *Brucella abortus*, *B. melitensis*

tularemia - *Francisella tulharensis*

febre de Query - *Coxiella burnetti*

2. Intoxicações Alimentares

botulismo - *Clostridium botulinum* (patogênica)

intoxicações estafilocócica - *Staphylococcus aureus*

3. Infecções Alimentares

Enterobactérias : *Shigella* (shigelose); *Salmonella* (salmonelose, febre tifóide, febre paratifóide); *Yersinia enterocolítica* (yersiniose); *Escherichia coli*

Bactérias de importância na saúde pública : *Campylobacter*; *Vibrio cholerae*; *Vibrio parahaemolyticus*

Bactérias Gram-positivas esporuladas patogênicas : *Clostridium perfringes*; *Bacillus cereus*; (gastrenterites)

poliomielite - *Poliovirus*

hepatite - Vírus da hepatite

4. Micotoxinas

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

causadas por bolores - *Aspergillus*, *Penicillium*,...

Microrganismos utilizados na produção de alimentos e enzimas

1. Produção de etanol - leveduras
2. Produção de ácidos orgânicos : produção de vinagre - Bactérias Acéticas - *Acetobacter*; produção de ácido láctico - Bactérias Lácticas; produção de ácido propiônico - Bactérias Propiônicas; produção de ácido cítrico; produção de ácido glucônico; produção de ácido fumárico; produção de ácido giberilinas
3. Produção de proteína unicelular
4. Produção de aminoácidos - lisina, ácido glutâmico
5. Produção de enzimas
6. Produção de antibióticos
7. Produção de solventes
8. Produção de polissacarídeos
9. Produção de lipídeos
10. Produção de alimentos por fermentação láctica : pickles, azeitona, queijo, chucrute, iogurte

Psicotróficos associados com a deterioração de alimentos refrigerados e congelados -

Bastonetes Gram negativos, aeróbios, não esporulados - *Pseudomonas*; *Acetobacter*

CAPÍTULO 2: Conservação dos Alimentos

Grupos de Alimentos

Vegetais

- cereais e seus produtos
- açúcar e produtos açucarados
- verduras e derivados
- frutas e derivados

* condimentos e fungos cultivados como alimentos (leveduras, fungos inferiores, etc) também são incluídos neste grupo

Animais

- carne e produtos canecos
- aves e ovos
- pescado e outros alimentos marinhos
- leite e derivados

a maioria dos alimentos é facilmente alterada pelos microrganismos, a não ser que se submetam a algum tratamento conservador

Princípios em que se baseia a Conservação de Alimentos

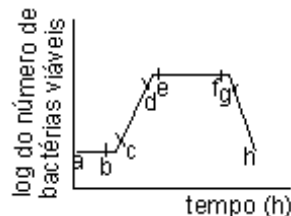
1. Prevenção ou atraso (vida de prateleira) da decomposição bacteriana
o mantendo os alimentos sem germes (asepsia)
o eliminando os germes existentes (p.ex.: filtração)

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- o colocando obstáculo ao crescimento e atividade microbiana (emprego de baixas temperaturas, dessecação, condições anaeróbicas, conservadores químicos)
- o destruindo os microrganismos (calor ou radiação)
- 2. Prevenção ou atraso da autodecomposição dos alimentos
 - o destruindo ou inativando suas enzimas (escaldando)
 - o prevenindo ou atrasando as reações puramente químicas (evitando a oxidação por meio de antioxidantes)
- 3. Prevenção das lesões ocasionadas por insetos, animais superiores, causas mecânicas, etc

Para melhor conservar os microrganismos deve-se prolongar ao máximo as fases de latência (a-b) e aceleração positiva (b-c) da curva de crescimento. Para tanto deve-se :

- o procurar que chegue ao alimento o menor número possível de microrganismos - quanto menor o número de organismo, maior a fase de latência
- o evitar contaminação por germes no crescimento ativo (em fase logarítmica), presentes em recipientes, maquinarias ou utensílios sujos
- o criar condições ambientais desfavoráveis para os germes - alimento, umidade, temperatura, pH ou potencial de O/R desfavoráveis; ou presença de inibidores microbianos. Quanto maior o número de condições desfavoráveis mais tardará a iniciar o crescimento



a-b = latência; b-c = aceleração positiva; c-d = logarítmica; d-e = aceleração negativa; e-f = estacionária; f-g = destruição acelerada; g-h = declive

Métodos de Conservação dos Alimentos

1. Assepsia :

- forma de impedir que os microrganismos cheguem ao alimento
- aplicada principalmente aos alimentos crus ainda
- importante saber a classe (de quem se trata, se é patógeno); o número (o tamanho do perigo e do tratamento, a carga)

2. Eliminação de Microrganismos :

- filtração (impenetráveis às bactérias) - principal
- centrifugação, lavado, expurgo

3. Manter Condições Anaeróbicas :

- em recipientes fechados à vácuo por ex.; enlatados
- aeróbios termoresistentes não germinam nem crescem na ausência de oxigênio, mesmo tendo resistido às condições de temperatura aplicada

4. Conservação mediante o emprego de temperaturas altas :

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

A destruição dos microrganismos pelo calor se deve a **coagulação de suas proteínas** e especialmente à **inativação das enzimas** necessárias para seu metabolismo

O tratamento térmico a escolher para destruir a célula vegetativa e esporos depende :

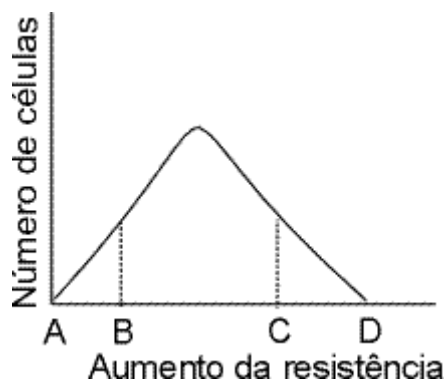
- da classe do microrganismo que se vai destruir (sua temperatura ótima, sua faixa de crescimento...)
- de outros métodos de conservação que se vai empregar (para amenizar ou acentuar a temperatura aplicada)
- dos efeitos do calor sobre o alimento (não deverá destruir todo seu conteúdo protéico, enfraquecer o alimento)

Termoresistência dos Microrganismos e de seus Esporos

A resistência ao calor dos microrganismos se expressa geralmente como **tempo de destruição térmica** - tempo necessário para destruir, a uma dada temperatura, um número determinado de organismos em condições específicas

Fatores que afetam a termoresistência bacteriana - tempo de destruição térmica

População de formas vegetativas ou esporuladas



Nota-se pela figura acima que algumas células apresentam resistência baixa (A-B), outras resistência média (B-C); e outros grupos apresentam alta resistência (C-D), os quais provavelmente são os esporos. O tratamento no entanto deve atingir à toda população. Para tanto deve-se levar em conta :

- relação temperatura x tempo - quanto maior temperatura menor o tempo de destruição
- concentração de esporos (células) - quanto maior número de esporos mais intenso será o tratamento térmico para a destruição do microrganismo
- condições prévias das bactérias e esporos - as condições de crescimento da bactéria e de produção de esporos, assim como o tratamento posterior, influenciará em sua resistência ao calor :
 - o meio de cultivo - quanto melhor para o desenvolvimento da bactéria mais resistente será
 - o temperatura de incubação - quando crescem na ótima aumenta a resistência
 - o idade - as jovens são menos resistentes que as maduras
 - o dessecação - esporos dessecados são mais difíceis de destruir
- composição do substrato em que se aquece as bactérias ou esporos
 - o umidade - calor úmido é mais potente para destruir (15 - 30 min a 121 °C) que o calor seco (3 - 4 horas a 160-180 °C)
 - o pH - mais resistente em pH neutro, esta resistência cai mais quando se baixa o pH (ácido) do quando se eleva (básico)

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

o outros constituintes do substrato - NaCl em concentrações baixas tem efeito protetor para certos esporos; o açúcar também

Termoresistência das Leveduras e seus Esporos :

- sua resistência ao calor úmido varia com : (1) as diferentes espécies, inclusive com as cepas; (2) substrato em que se aquece
- em geral os esporos são destruídos com apenas 5 - 10 °C a mais de temperatura que a necessária para destruir formas vegetativas
- ascosporos - destruição de 10 - 15 min/60 °C; nenhum resiste a um breve aquecimento a 100 °C
- formas vegetativas - destruição a 50-58 °C/10 - 15 min

Termoresistência dos Bolores e seus Esporos :

- a maioria é destruída a 60 °C/10 - 15 min (até os esporos)
- esporos assexuais são mais resistentes que o micélio; de 5-10 °C a mais para destruí-los
- esporos fúngicos são bastante resistentes ao calor seco; 120 °C/30min não são eficientes para sua destruição

Termoresistência das Bactérias e seus Esporos :

- varia muito : desde os patógenos que são facilmente destruídos até outros que necessitam de 80-90 °C por vários minutos
- termoresistência das células vegetativas - os cocos são geralmente mais resistentes que os bacilos (com exceções notáveis)
- quanto maior a temperatura ótima e máxima de crescimento maior será a termoresistência
- as bactérias que possuem cápsula ou formam grânulos são mais difíceis de destruir, assim como as com alto conteúdo lipídico

Termoresistência de Enzimas :

- a maioria das enzimas dos alimentos e dos microrganismos são destruídas a 79,4 °C

Penetração do Calor

- a penetração do calor desde onde se produz até por ex. o centro de uma lata (onde contém o alimento) pode ser : (1) por condução (de molécula a molécula) ou (2) por convecção (pelo movimento de líquidos ou gases)
- os fatores que determinam o tempo necessário para elevar a temperatura do centro do recipiente à temperatura de esterilização são os seguintes :
 - o o material da embalagem - mais lento nos vidros que nas latas
 - o tamanho e forma do recipiente - alto e delgado esquentar antes que um baixo e largo de mesmo volume
 - o temperatura inicial do alimento - importante que seja alta para que o microrganismo passe mais tempo em uma temperatura letal a ele, mais não que vá diminuir o tempo de destruição
 - o temperatura da autoclave - quanto mais quente no início mais rápido atinge as temperaturas letais ao microrganismo
 - o consistência do conteúdo da lata e forma e tamanho das porções dos alimentos - pedaços maiores são mais rapidamente aquecidos que os menores
 - o rotação e agitação - aceleram a penetração do calor se o alimento é totalmente fluido

Recomenda-se o esfriamento rápido artificial porque é facilmente regulável. O esfriamento demasiado lento pode dar lugar ao sobrecozimento do alimento e permitir o crescimento dos germes termófilos

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Determinação do Tratamento Térmico

Para tanto devem-se ter os seguintes dados :

- a curva de destruição térmica dos organismos mais termoresistentes que podem estar presentes no alimento
- as curvas de penetração do calor e da refrigeração dos alimentos em relação com a forma e tamanho do recipiente empregado

Para determinar o tratamento térmico se emprega um desses três métodos :

1. Método gráfico
2. Método da fórmula matemática
3. Método de nomograma

Método Geral para calcular o tempo do tratamento

$t = F \text{ antilog } (250 - T)/z$; onde t = tempo em minutos

Tratamentos Térmicos empregados na elaboração de Alimentos

- a temperatura e tempo de tratamento de um alimento dependerão do efeito que o calor exerça sobre tal alimento e de outros métodos de conservação que se vai empregar conjuntamente
- alguns alimentos só se podem esquentar até certo limite, se não há mudanças no aspecto, ou perda de valor (como o leite), já outros não (como o milho)
- quanto maior o tratamento térmico maior o número de germes destruídos até chegar ao aquecimento que ocasione a esterilidade do produto
- se não destruir todos os microrganismos o tratamento deve pelo menos destruir os que representam perigo potencial
- nos alimentos enlatados tem que destruir todos os microrganismos que possam alterar o alimento durante as últimas fases de fabricação
- os diferentes graus de aquecimento usados nos alimentos se classificam em : (1) Pasteurização; (2) Aquecimento ao redor de 100 °C; (3) Aquecimento acima de 100 °C

(1) Pasteurização

Tratamento térmico que destrói parte, mais não todos os microrganismos presentes. Se realiza a temperaturas abaixo de 100 °C

- o aquecimento se verifica por meio: vapor, água quente, calor seco, ou correntes elétricas - sempre esfriando rapidamente os produtos depois do aquecimento
- emprega-se a pasteurização quando :
 - o tratamento térmico mais elevado danificaria a qualidade do produto (ex.: o leite)
 - o um dos objetivos é a destruição de germes patogênicos (ex.: o leite)
 - o os agentes de alteração mais importantes não são muito termoresistentes (ex.: as leveduras dos sucos de frutas)
 - o os microrganismos sobreviventes se controlam por outros métodos adicionais (refrigeração do leite comercial)
- os métodos de conservação que se emprega para completar a pasteurização são :
 - o refrigeração (ex.: o leite)
 - o embalagem sendo em recipiente fechado
 - o manter condições anaeróbicas (embalagens fechadas à vácuo)
 - o adicionar concentrações altas de açúcar (leite condensado)
 - o presença ou adição de conservadores químicos (ácidos orgânicos dos embutidos)

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- os tempos e temperaturas de pasteurização dependem do método empregado e do produto que se vai tratar :

temperatura alta, tempo curto ----- 71,1°C/15 seg

temperatura baixa, tempo longo ----- 62,8°C/30 min

(1) Aquecimento a aproximadamente 100°C

Tratamento suficiente para destruir todos os microrganismos, menos os esporos bacterianos

- conservas caseiras (ajudadas com a panela de pressão para alimentos não tão ácidos)

(1) Aquecimento acima de 100°C

Temperaturas superiores a 100°C se alcança em autoclaves com vapor à pressão, esterilizadores ou "retortas"

- a temperatura dos esterilizadores aumenta ao elevarem-se as pressões de vapor. Ex. temos a temperatura da água fervendo (em nível do mar) sem pressão a 100 °C :
 - o com 5 libras de pressão --- 109 °C
 - o com 10 libras de pressão --- 115,5 °C
 - o com 15 libras de pressão --- 121,5 °C
- a sigla UHT (temperatura ultra elevada) que agora costuma vir nas caixas de leite significa que o leite foi esquentado a temperatura superior a 150 °C por injeção de vapor seguido da evaporação instantânea do que se há condensado, e de um esfriamento rápido. Mantendo durante um tempo suficiente, alguns segundos, este tratamento é capaz de esterilizar o leite

5. Conservação mediante o emprego de Baixas Temperaturas

Usado para retardar as reações químicas e a ação das enzimas, e atrasar ou inibir o crescimento e atividade dos microrganismos que se encontram nos alimentos.

Quanto mais baixa a temperatura mais lenta serão as reações químicas, as ações enzimáticas e o crescimento microbiano. Uma temperatura suficientemente baixa inibirá o crescimento de todos os microrganismos

Crescimento dos microrganismos à temperatura baixa

- o **congelamento evita** a prolongação da maior parte dos microrganismos. A **refrigeração diminui** sua velocidade de crescimento
- temperaturas de 5 ou 6 °C retardam a multiplicação dos microrganismos produtores de intoxicação alimentar, com exceção do *Clostridium botulinum* tipo E
- se há encontrado microrganismo crescido em até -17°C

Temperaturas empregadas no armazenamento a baixa temperatura

Os armazenamentos mais utilizados comercialmente estão abaixo dos -18 °C

Refrigeração :

- temperatura não muito superior à de congelamento
- com emprego de gelo, ou refrigeração mecânica

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- tanto pode ser empregado como método principal para conservar alimentos ou como um sistema temporário até que se aplique outra forma de conservação
- fatores a considerar : temperatura de refrigeração, umidade relativa, velocidade do ar, e composição da atmosfera do local e possível emprego de radiações UV

(1) Temperatura :

- quanto mais baixa mais caro resulta
- selecionada de acordo com : classe de alimento, tempo e condições de armazenamento
- alguns alimentos apresentam temperatura ótima de armazenamento bem acima da de congelação - a banana p.ex. não deve ser conservada no refrigerador, pois apresenta a melhor temperatura de conservação entre 13,3 - 16,7 °C; enquanto as batatas já se armazenam melhor a 10 - 12,8 °C
- a temperatura dos refrigeradores é controlada mecanicamente, apesar de que variam entre 0 e 10 °C nas diferentes partes do mesmo

(2) Umidade relativa

- umidade baixa faz com que as frutas p.ex. percam e água e enrugam na sua superfície
- umidade relativa alta favorece o desenvolvimento de microrganismos causadores de alterações. Superfícies úmidas favorecem a alteração microbiana, como ocorre na formação de mucilagem ou viscosidade na superfície úmida dos embutidos - molho de tomate

(3) Ventilação ou controle da velocidade do ar

- é importante para manter uma umidade relativa uniforme, para eliminar odores, para evitar o aparecimento de odor e sabor velho

(4) Composição da atmosfera de armazenamento

- a quantidade e proporção dos gases da atmosfera influenciam muito
- na presença de concentrações ótimas de CO₂ ou O₃ :
 - o o alimento permanece inalterado por mais tempo;
 - o pode manter umidades relativas maiores, sem que se coloque em risco a conservação e qualidade do alimento;
 - o pode-se empregar temperatura de armazenamento mais alta que as de refrigeração
- a concentração ótima de CO₂ na atmosfera varia com o tipo de alimento conservado (2,4% para ovos, 10% para carne refrigerada, 100% para bacon)

(5) Irradiação

- a combinação de radiação UV com refrigeração ajuda na conservação de certos alimentos - permitindo o emprego de umidade e temperaturas mais altas do que se pode usar com refrigeração
- algumas salas de armazenamento de queijo e carne se têm instalado lâmpada UV

Congelamento

- a qualidade do alimento a congelar é de extrema importância.
- a maioria dos alimentos se empacota antes do congelamento, mais outros como os morangos, primeiro são congelados
- a temperatura de congelamento é geralmente de -23,3 °C ou menor, mais pode variar entre -15 e -29, sendo o tempo necessário de 3-12 horas. A congelação rápida em geral se realiza em 30 minutos ou menos, e geralmente o alimento se congela em pequenos pacotes ou pedaços

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Vantagens que a congelação rápida apresenta sobre a lenta :

- formação de cristais de gelo menores e portanto escassa destruição mecânica das células do alimento
- tempo de solidificação menor e portanto menor o tempo para difusão dos materiais solúveis e para a separação do gelo
- previne-se antes do crescimento microbiano
- o retardamento da ação enzimática é mais rápido
- o estado em que se encontra o alimento a congelar determina sua qualidade potencial uma vez congelado. O congelamento rápido atrasa logo as reações químicas e enzimáticas dos alimentos detendo o crescimento microbiano, o mesmo efeito produz o congelamento intenso ou lento, mais menos rápido
- o volume do alimento aumenta e se formam cristais de gelo que aumenta de tamanho. Geralmente tais cristais são maiores na congelação lenta, acumulando mais gelos entre as células

Efeito das temperaturas de congelamento sobre os microrganismos

- esfriamento das células a 0 °C
- posterior esfriamento com formação de cristais de gelo fora e possivelmente dentro das células
- concentração de solutos intra e extra celulares
- armazenamento das células em estado de congelamento
- descongelamento das células e do substrato

Efeitos Letais

- o congelamento não é um sistema de esterilização apesar de destruir muitas células
- os efeitos letais estão encontrados na **desnaturação ou floculação das proteínas ou enzimas celulares** - concentração dos solutos na água não congelada e lesão física dos cristais de gelo
- o rápido esfriamento das células desde sua temperatura ótima até 0 °C pode também produzir sua morte (choque frio) - relaciona-se com as alterações dos lipídeos da membrana que dificulta a permeabilidade celular

6. Conservação por Dessecação

Qualquer método que reduza a quantidade de umidade disponível num alimento é uma forma de dessecação : sal para pescado dessecado; açúcar para o leite condensado; raios solares para a carne de sol

A liofilização é um método de dessecação - sublimação da água de um alimento congelado por meio do vácuo e da aplicação do calor ao recipiente de dessecação

Fatores que controlam a dessecação : temperatura, umidade, velocidade do ar e tempo de dessecação

Tratamento dos alimentos antes da dessecação

- seleção e classificação (tamanho, grãos maduros, estado sanitário)
- lavagem (especialmente frutas e hortaliças)
- descascamento (a mão, mecanicamente, por banho alcalino ou por abrasão)
- cortar em pequenos pedaços
- banhos alcalinos
- branqueamento ou escaldado das hortaliças e de algumas frutas

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- sulfuração de frutas pouco coloridas (com dióxido de enxofre)

Tratamento depois da dessecação

- transpiração - armazenamento em caixas para que se iguale a umidade
- empacotamento - se empacota imediatamente após a dessecação
- pasteurização - para destruição dos microrganismos patogênicos que ainda possam existir

7. Conservação por Aditivos

Aditivos de alimento - é uma substância ou mescla de substância que sem formar parte da matéria básica do alimento se encontra neste como consequência de qualquer circunstância relacionada com a produção, armazenamento e envasado

Conservadores químicos - aditivos que se adiciona especificamente para evitar a deterioração ou decomposição dos alimentos

O conservador antimicrobiano ideal :

- há de possuir um amplo espectro de atividade antimicrobiana
- não ser tóxico ao homem ou animal
- econômico
- não afetar o sabor dos alimentos originais
- não ser inativado pelo alimento
- não favorecer o desenvolvimento de cepas resistentes
- ser mais capaz de destruir que inibir os microrganismos

Conservadores adicionados aos alimentos

Aqueles não definidos como tal por lei :

ácidos orgânicos naturais (lático, málico, cítrico) e seus sais; vinagres (acético é um ácido natural - mais efetivo frente as leveduras e bactérias que frente aos mofos), NaCl, açúcares especiais, seus óleos, CO₂, nitritos e nitratos (os nitritos podem agir com aminas secundárias e terciárias para formar nitrosaminas que são carcinogênicas)

Substâncias reconhecidas como de confiança para adicionar aos alimentos (GRAS):

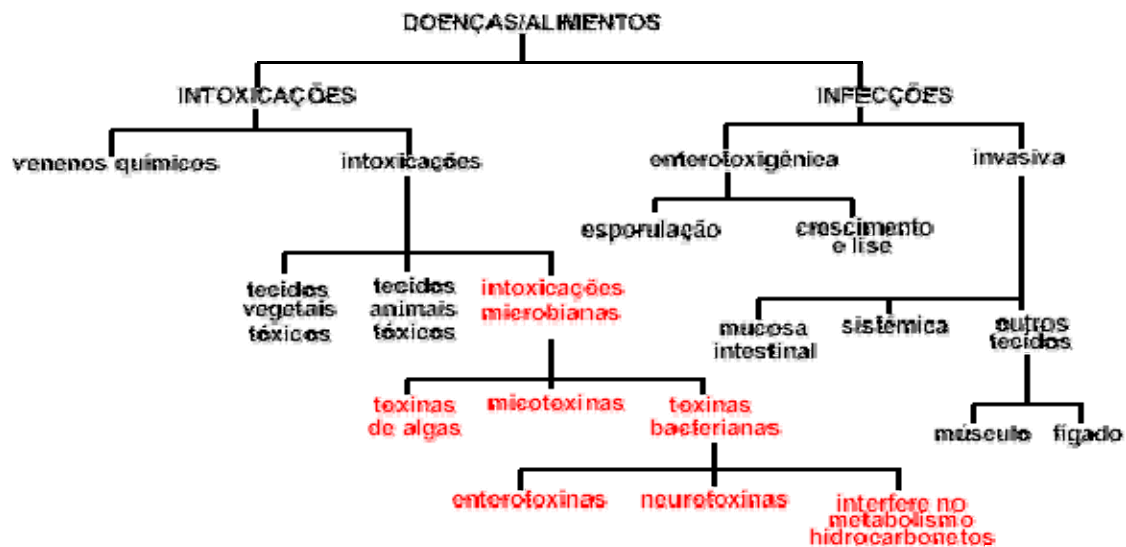
ácido propiônico (afeta a permeabilidade da membrana - usado para evitar proliferação de mofos e formação de elementos filamentosos), ácido caprílico, ácido sórbico e sorbatos (inibe leveduras e mofos, menor frente às bactérias), K, Na, Ca, ácido benzóico, benzoato e outros derivados do ácido benzóico (ésteres metil e propílico do ácido parahidroxibenzóico)

CAPÍTULO 3: Alimentos e Doenças

Doenças humanas transmitidas pelos alimentos e pela água

Doenças de origem alimentar - o alimento contaminado se constitui no mais importante veículo do agente patogênico - via oral e via de penetração do patógeno no organismo humano. As doenças de origem alimentar podem ser divididas em duas grandes categorias : As Intoxicações e as Infecções

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS



Intoxicações e Infecções de origem Bacteriana

INTOXICAÇÕES	INFECÇÕES
Estafilocócica: enterotoxina causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	Salmonelose: endotoxina por <i>Salmonella</i>
Botulismo: neurotoxina produzida por <i>Clostridium botulinum</i>	Doença causada por <i>Clostridium perfringens</i> : enterotoxina liberada durante sua esporulação
	Gastreenterite por <i>Bacillus cereus</i> : exoenterotoxina liberada durante sua lise no trato intestinal
	Infecção por <i>Escherichia coli</i> enteropatógeno: vários sorotipos, algumas invasivas e outras enterotoxigênicas
	Outras <i>Yersinia</i> , Shigelose, <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Intoxicação Alimentar Bacteriana

É uma doença causada pela presença de uma toxina bacteriana formada no alimento

1. Botulismo

Uma das mais graves doenças, causada pela ingestão de alimentos que contem a neurotoxina produzida por *Clostridium botulinum*.

Clostridium botulinum

Características fisiológicas

- bastonetes Gram +
- esporulado
- anaeróbios

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- temperatura ótima: 30 a 37°C
- pH: 4,5 a 8,0
- Tipos: A, B, C, D, E, F, G
- produtores de gás (fermentam carboidrato)

Habitat

- solo
- trato intestinal de animais
- alimentos (peixes, rações)
- sedimentos de oceanos e lagos

Disseminação: animais sadios portadores assintomáticos, solo e poeira

Alimentos envolvidos: Em geral alimentos de baixa e média acidez (não ácidos)

- conservas caseiras
- alimentos embalados à vácuo
- enlatados consumidos sem cozimento.

Desenvolvimento e produção de toxina

- depende da capacidade de crescimento das células de *C. botulinum* e a autólise delas no alimento
- conteúdo de água ideal para produção da toxina: 40% (30% inibe a produção); 8% NaCl inibe o crescimento da bactéria
- pH menor que 4,5 impede a formação da toxina

Toxina

- é uma proteína com características de neurotoxina
- é absorvida no intestino delgado e paralisa a musculatura
- inativação a 80 °C/5-6 min ou 90°C/15 min.
- as neurotoxinas A, B, E, F - causa doenças humanas; as neurotoxinas C, D - doenças em animais (galinhas, patos, eqüinos); dose letal: 1 a 2 mg/kg

Resistência térmica dos esporos

- alta resistência
- em geral o tratamento térmico aplicado é ; 100°C/360 min ou 105°C/120 min, 110°C/36 min, 115°C/12 min, 120°C/4 min (dependente do alimento)

Sintomas

- antes do desenvolvimento dos sintomas neurológicos, perturbações gastrointestinais ocorrem (tais como náuseas, vômito, diarreias, prisão de ventre, etc)
- distúrbios visuais
- paralisia dos músculos da face, cabeça e faringe
- paralisia respiratória
- **taxa de mortalidade alta.**

Período de incubação: 12 a 48 horas

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Duração da doença: o processo toxicológico dura de 3 a 6 dias; e a recuperação pode levar alguns meses.

Controle

- tratamentos térmicos adequados de alimentos, assegurando a destruição total de esporos
- uso de métodos químicos e físicos (redução de Aa, acidificação) que inibem totalmente o desenvolvimento da bactéria

2. Intoxicação Estafilocócica

Doença causada pela ingestão da enterotoxina formada quando crescem nos alimentos certas cepas de *Staphylococcus aureus*. A toxina é denominada enterotoxina por causar gastroenterite ou inflamação das mucosas gástrica ou intestinal

Staphylococcus aureus

Características fisiológicas

- cocos Gram +
- anaeróbios facultativos ou aeróbios
- temperatura ótima: 35-37°C (10-45°C)
- pH: 7,0 a 7,5 (4,2 a 9,3)
- elevada tolerância ao sal: toleram meios com 10 a 20% de NaCl
- atividade de água (Aa) : 0,99 a 0,86

Habitat: homem e animais de sangue quente (mucosa nasal; garganta, cabelos e pele).

Disseminação

- manipuladores de alimentos
- úbere de vaca
- pele e carcaça de animais
- equipamentos e utensílios.

Alimentos envolvidos

- aves congeladas
- saladas (batata, ovos, atum)
- bolos recheados (doces com creme, tortas)
- leite cru
- sorvetes

Dose infectante: acima de 10⁵ UFC/ g de alimento; nestas condições, quantidades suficientes de enterotoxinas serão produzidas e liberadas no alimento causando a intoxicação quando for ingerido

Enterotoxina

- proteínas simples, com PM de 27.300 a 34.000 daltons
- designadas, A, B, C1, C2, D e E, com base em suas reações com anticorpos específicos (termoresistentes)

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Dose da enterotoxina: 0,015 a 0,357 mg/kg corpóreo

Período de incubação: média de 1 a 6 horas

Sintomas: náuseas, vômitos., diarreias, dores abdominais e em alguns casos, salivação intensa, sudorese e desidratação

Outras infecções: processos supurativos, superficiais ou profundos

Duração: 24 horas, sendo a intoxicação raramente fatal

Infecção Alimentar Bacteriana

1. Salmonelosis, Febre tifóide, Febre paratifóide

Salmonella

Características fisiológicas

- bastonetes Gram -
- anaeróbios facultativos
- temperatura ótima: 35 a 37°C (5 a 45°C)
- pH ótimo: 6,5 a 7,5 (4,5 a 9,0)
- resistência térmica: baixa, 60°C/ 5 min
- espécies mais conhecidas: *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B, C

Habitat: trato intestinal do homem e animais

Disseminação

- alimentos, principalmente de origem animal - carnes preparadas, aves, ovos, derivados do leite
- produtos de panificação
- saladas diversas

Sintomas

- febre (38 a 39°C)
- diarreia mucosa, ocasionalmente com sangue
- dores abdominais, náuseas, vômitos.

Período de incubação: 1 a 168 h (6 a 48 h)

Duração: 2 a 5 dias

Dose infectante: 10⁵ a 10⁶ UFC/mg

2. Gastreenterite por *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens

Características fisiológicas

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- bastonetes Gram +
- esporulado
- microaerofílico
- imóvel
- temperatura ótima: 37 a 47°C
- pH: 5,5 a 8,0
- Tipos A, B, C, D e E de acordo com capacidade para síntese de toxinas

Habitat: trato digestivo do homem e animais, água e solo, poeira

Alimentos envolvidos

- produtos cárneos (bovinos, aves),
- molhos
- temperos
- tortas
- saladas
- queijos tipo frescal

Dose infectante: acima de 10⁶ a 10⁸ UFC/mg de alimento

Enterotoxina: 12 toxinas diferentes, designadas por letras gregas, termolábil, com inativação a 60°C por 10 min.

Sintomas

- severa diarreia com odor fétido
- dores abdominais
- grande quantidade de gases
- vômitos e febres (incomuns)

Outras infecções

- gangrena gasosa
- infecções pós-aborto
- enterite necrosante

Período de incubação: 8 a 24 horas

Duração da doença: 24 horas, sendo normalmente de pouca gravidade

3. Infecção por *Escherichia coli* enteropatogênica

Escherichia coli

Características fisiológicas

- bastonetes Gram
- anaeróbios facultativos
- temperatura ótima: 35 a 37°C
- pH ótimo: 6,5 a 7,5
- fermentam a lactose com formação de gás a 35°C

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Classificação:

- * E. coli enteropatogênica clássica;
- * E. coli enterotoxigênica;
- * E. coli enteroinvasiva;
- * E. coli enterohemorrágica.

Habitat: trato intestinal do homem e animais.

Disseminação: material fecal e por meio de vários veículos pode vir a contaminar a água e os alimentos. Tipo Toxigênico Tipo Invasivo produtor de toxinas processo infeccioso das mucosas intestinal

Sintomas : diarreia intensa aquosa, febres, náuseas, vômitos, dores abdominais, fezes sanguinolentas

Dose de infecção : 10⁷ a 10⁸ UFC/mg 10⁶ a 10⁷ UFC/mg

Período de incubação : 6 a 36 h 6 a 36 h

Duração dos sintomas : 1 a 3-4 dias 1 a 3-4 dias

4. **Outras** : Infecção por *Vibrio parahemolyticus*, Gastreenterite por *Bacillus cereus*, Shigelosis por *Shigella* spp, Yersiniose, por *Yersinia* spp.

Bactérias Coliformes

As doenças entéricas causadas pelas bactérias coliformes são transmitidas quase exclusivamente pela contaminação fecal de água e alimentos. A transmissão através de águas contaminadas constitui uma das mais sérias fontes de infecção responsável por ex. por grandes epidemias de doenças entéricas graves como febre tifóide e cólera. Para se avaliar a presença de organismos patogênicos na água, é determinado a presença ou ausência de um organismo e respectiva população que esteja presente na água, sempre que organismos patogênicos estejam, indicando a contaminação. Esse organismo é chamado de indicador.

Esse indicador deve apresentar as seguintes características:

- ser aplicável a todos os tipos de água;
- ter uma população mais numerosa no ambiente que os patógenos;
- não crescer na água;
- sobreviver melhor que os possíveis organismos patogênicos;
- ser detectado através de uma metodologia simples e barata.

Infelizmente, não existe um indicador ideal da qualidade sanitária da água, mas sim alguns organismos que se se aproximam das exigências referidas. Para possibilitar a comparação de dados obtidos nas diferentes localidades e laboratórios, a metodologia deve ser padronizada tanto na detecção como na amostragem. Todo material a ser usado deve ser previamente esterilizado e a coleta feita em condições assépticas. O transporte deve ser rápido e as amostras mantidas em banhos de gelo. Para amostras de água clorada deve-se neutralizar o cloro imediatamente após a coleta, com 100 mg/ml de solução esterilizada de tiosulfato de sódio.

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Indicadores de poluição fecal

- o indicador de poluição fecal mais empregado é o grupo coliforme.
- são organismos típicos da microflora fecal, podendo a maioria ser encontrado em outros locais.
- a espécie *Escherichia coli* é considerada como sendo de origem unicamente fecal.
- a detecção e medida de bactérias coliformes têm sido efetuadas na água desde o fim do século XIX.
- a metodologia emprega um meio seletivo com inibidores de Gram + e capacidade de fermentação da lactose.
- a temperatura de incubação elevada, de 35-37°C, para coliformes totais, e 44,5 ±0,2°C para coliformes fecais, tem como objetivo evitar o crescimento de bactérias não fecais mais adaptadas a temperaturas mais baixas do meio ambiente. Por esse motivo, o teste de coliformes fecais torna-se mais seletivo para *Escherichia coli*, e mais específico para determinação de contaminação de origem fecal.
- a metodologia padrão empregada no exame bacteriológico da água, para medida da água, para medida do grupo coliforme, inclui dois procedimentos: a técnica dos tubos múltiplos e a técnica da membrana filtrante.

Outros indicadores

Nenhum indicador é perfeito e aqueles destinados a determinar a contaminação fecal certamente não funcionam adequadamente como indicadores de poluição de outras origens. Os coliformes e outros indicadores fecais podem ser suplementados com indicadores adicionais que compensem a ineficiência destes na monitoragem de poluição diversificada. Vários grupos de microrganismos têm-se mostrado adequados para essa finalidade: Bactérias heterotróficas; Leveduras; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; Vírus

Intoxicações e Infecções alimentar de natureza não bacteriana

Doenças transmitidas pelos Vírus

Doença	Agente	Alimento	Outra forma de transmissão	Incubação e Sintomas	Prevenção
Poliomielite	Poliovírus tipos I, II, III	leite e outras bebidas preparadas	doentes ou portadores, água contaminada	5 - 35 dias; febre, vômito, dor muscular	higiene pessoal, aquecimento correto dos alimentos
Hepatite infecciosa	Vírus da hepatite infecciosa	leite, mariscos, salada de batata	doentes ou portadores, água contaminada	10 - 50 dias; perda de apetite	cozimento dos mariscos
Gastroenterite aguda não bacteriana	Vírus Coxsackii	possivelmente por alimentos	doentes ou portadores, água contaminada	27 - 60 horas; febre, vômito e diarreia	higiene pessoal, aquecimento correto dos alimentos

Doenças transmitidas pelos Fungos

1. Micotoxicosis

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Doença produzida pela ingestão de toxina com alimento contaminado com fungos (micotoxinas). São tóxicas e carcinogênicas. E atingem mais os animais que os homens

Micotoxinas

- são produtos metabólicos secundários produzidos pelos bolores que causam alterações biológicas prejudiciais aos seres humanos e outros animais
- podem estar contidas : no interior dos esporos de bolores, em seus micélios, ou então serem liberados no alimento contaminados por estes microrganismos
- ocorrem principalmente em : cereais e oleaginosas (arroz, milho, trigo, cevada, amendoim, algodão, etc).
- toxicidade crônica : carcinogênica, hemorrágicas, etc, e mais freqüentemente atuando como hepatotóxica, nefrotóxica, ou neurotóxica
- legislação dos USA aplica uma tolerância para aflatoxinas em alimentos ou cereais destinados à ração de 20 µg/Kg até 200 µg/Kg (ppb) - estipulado mais por ordem econômica que por aspecto de saúde pública

Micotoxinas importantes nos alimentos

Micotoxina	Bolores que elaboram	Alimentos	Animais afetados
Aflatoxina	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> ; <i>Penicillium</i>	milho, algodão, aveia, cacau, arroz, soja, trigo, mandioca, batata, amendoim	gato, frango, salmão, faisão, coelho, cachorro, peru, rato, ovelha
Patulina	<i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>	suco de maçã, melancia	rato, coelho, camarão
Ocratoxina A	<i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>	milho, trigo, cevada, ervilha, ovo de galinha, cacau	ratos, patos, frango
Luteoesquirina	<i>Penicillium islandicum</i>	farinha de arroz	rato, frango
Esterigmatocisteína	<i>Penicillium islandicum</i>	trigo, aveia	rato
Ácido penicílico	<i>Penicillium islandicum</i>	ervilha seca, tabaco	rato
Aleuxia tóxica	<i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Alternaria</i>	grãos de cereais	homem, rato
Roquefortina	<i>Penicillium roquefort</i>	queijo	rato

Doenças transmitidas pelos parasitas

Agente causal	Alimentos	Incubação	Sintomas	Prevenção
<i>Anisakis</i> spp	pescados crus ou insuficientemente cozidos	vários dias	irritação da faringe e do trato digestivo	cozinhar totalmente o pescado
<i>Entamoeba histolytica</i>	águas contaminadas com água residual, alimentos úmidos contaminados com fezes humanas	de vários dias a 4 semanas	diarréia de distinta gravidade	proteção do abastecimento de água
<i>Taenia saginata</i>	carne de vaca crua ou insuficientemente cozida	várias semanas	dor abdominal, sensação de	cozinhar totalmente a

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

	cozida		fome, mal-estar indefinido	carne de vaca
<i>Diphyllobothrium</i>	pescados crus ou insuficientemente cozidos	de 3 a 6 semanas	geralmente nenhum; anemia em infestações massivas	cozinhar totalmente o pescado
<i>Taenia</i>	carne de porco crua ou insuficientemente cozida	várias semanas	transtorno digestivo, intenso mal-estar	cozinhar totalmente a carne de porco
<i>Trichinella</i>	carne de porco ou produtos derivados de porco crus, carne de baleia, de foca, de urso com larvas vivas	9 dias	náuseas, vômitos, diarreia, febre, respiração fadigosa	cozinhar totalmente a carne de porco; congelar a carne (-15 °C/30 dias)

Medidas Gerais para o controle das doenças

1. alimento deve ser bem cozido
2. esfriar os alimentos em pequenas quantidades e rapidamente
3. desinfecção do aparelho, equipamento
4. não empregar água do mar para limpeza de equipamento ou para lavar os alimentos crus
5. higiene pessoal
6. preparação higiênica dos alimentos
7. luta contra moscas e roedores
8. eliminar os manipuladores com doenças respiratórias ou lesões cutâneas

Psicotróficos associados com a deterioração de alimentos refrigerados e congelados

Crescem em temperaturas de 0 °C, mas seu ótimo está em torno dos mesófilos : 20 - 30 °C.

Psicotróficos patogênicos - crescem em temperaturas igual ou menor que 5 °C :

- *Clostridium botulinum* tipo E, B, e F
- *Listeria monocytogenes*
- *Vibrium cholerae*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Escherichia coli* enteropatogênica (algumas linhagens)
- *Aeromonas hydrophila* (apenas suspeita-se)
- *Pseudomonas aeruginosa* e *P. cocovenenans*

Pseudomonas

Bactérias comuns do solo e da água, capazes de contaminar e deteriorar alimentos ricos em proteínas.

- bastonetes pequenos
- Gram -
- motilidade através de flagelos polares
- não esporulados
- aeróbios estritos

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- geralmente produzem pigmentos solúveis em água, que podem apresentar fluorescência sob luz ultravioleta: Ex. corante fenazínico piocianina (Fenazinas - cor verde- azulada intensa). Existem linhagens apigmentadas.
- algumas espécies de *Pseudomonas* são importantes agentes de doenças em plantas e no homem: *P. maltophilia*, *P. syringae*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. cocovenenans*.
- a propriedade fisiológica mais notável destas bactérias é a faixa muito ampla de compostos orgânicos diferentes que podem utilizar como fontes de carbono e energia. Dentre esses compostos estão: álcoois, ácidos, aminoácidos, carboidratos e compostos cíclicos. Esta extraordinária versatilidade metabólica exige uma tremenda bateria de enzimas especiais --- enzimas indutíveis.
- algumas espécies apresentam temperatura ótima de crescimento entre 20 a 25°C (são psicrófilas), e a 55°C são destruídas

Geralmente metabolizam hexoses (carboidratos) através da via ENTNER-DOUDOROFF, a qual é bem difundida entre as bactérias, principalmente as Gram -, e rara ou inexistente entre os anaeróbios. Esta via (E.D.) é de grande importância quando a bactéria está crescendo em meio rico em gluconato.

A degradação aeróbica dos substratos gera CO₂, como produto principal ou único, através do ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarboxílico). Para que ocorra a oxidação dos inúmeros substratos é verificado a presença de inúmeras rotas metabólicas especiais, que convergem para o ciclo de Krebs.

Via do beta-cetoadipato :Serve para a degradação de compostos aromáticos e ácidos dicarboxílicos, os quais são convertidos a acetil CoA e succinato (intermediário do ciclo de Krebs). Algumas das substâncias utilizadas através desta via são: benzoato, p-hidroxibenzoato, tolueno, feno, naftaleno, catecol e outros.

Espécies importantes na deterioração de alimentos

As espécies de *Pseudomonas* são predominantes em peixes estocados devido a duas características:

- psicrófilas e se multiplicam a temperatura de refrigeração;
- apresentam a capacidade para atacar várias substâncias nos peixes para produzir compostos associados com mau-cheiro (metil mercaptanos, dimetil sulfito, dimetil sulfeto, dimetil amina, 3-metil butanol, etc).
- no início, o peixe fresco possui a flora, cor e textura característica, com predominância de *Flavobacteria*.
- durante a refrigeração as *Pseudomonas* crescem facilmente. Após 9-10 dias de estocagem, 60 a 90% da população é de *Pseudomonas*.
- em peixe fresco *P. fragi* está em baixa porcentagem, porém, com 12 a 15 dias de estocagem esta espécie é responsável por 20-50% do total da flora contaminante.

As *Pseudomonas* são um dos gêneros predominantes em carnes de aves, ao lado de *Flavobacterium* e *Micrococcus*. Após a refrigeração, 90 a 95% da microflora é de *Pseudomonas*. Frango com população de 10⁸ células/g já apresenta mau cheiro.

Leite - a proteólise do leite sob refrigeração é iniciada por *Pseudomonas*. *P. fragi*, produz uma lipase termooestável que suporta a pasteurização quando presentes no leite cru.

Carnes - *Pseudomonas* e *Flavobacterium* causam limosidade e coloração esverdeada por pigmentos fluorescentes e pontos brancos. Em carnes a 10°C, as *Pseudomonas* predominam. Em carnes desidratadas, *P. fluorescens* pode causar também deteriorações e liberação de gás por desnitrificação.

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Vegetais - *P. syringae* causa o aparecimento de pigmento marrom escuro, no tomate, afetando sua aparência.

Ovos - *P. fluorescens* e *P. ovalis*, produzem pigmentos fluorescentes em ovos. Fazem parte da flora causadora da deterioração de ovos, sob condições de estocagem refrigerada.

CAPÍTULO 4: Alimentos e Enzimas Produzidos por Microrganismos

Os microrganismos tem sido utilizados pelo homem em diferentes processos e de diferentes maneiras. Muitas substâncias de considerável valor econômico são produtos do metabolismo microbiano, desde a produção industrial de materiais importantes incluindo, químicos finos (farmacêuticos) e aqueles produzidos em grandes quantidades que serão utilizadas como matéria-prima

Aplicações Biotecnológicas de microrganismos:

1. Produção de proteína unicelular
2. Produção de inseticidas
3. Produção de vacinas
4. Produção de antibióticos
5. Produção de etanol
6. Produção de ácidos orgânicos: ácido acético (vinagre); ácido lático; ácido propiônico; ácido cítrico; ácido glucônico
7. Produção de aminoácidos - lisina, ácido glutâmico
8. Produção de enzimas
9. Produção de solventes
10. Produção de polissacarídeos
11. Produção de lipídeos
12. Produção de alimentos por fermentação láctica : pickles, azeitona, queijo, chucrute, iogurte

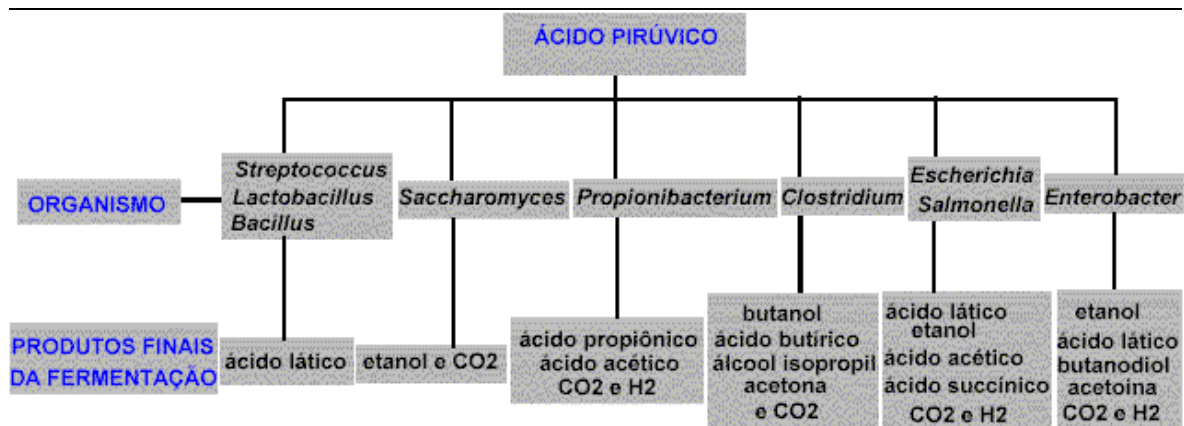
Produção de cultivos para fermentações de alimentos

Pode-se adicionar os microrganismos necessários para as fermentações alimentares como **cultivos puros** ou como **mistura de cultivos**. Ou ainda "**não se adiciona**" nenhum porque alguns alimentos ao fermentar já contém o microrganismo desejado em quantidades suficientes

De uma maneira geral os princípios de manutenção e preparação de cultivos segue;

1. Seleção - podem ser cultivos já estabelecidos (provenientes de outros laboratórios) ou se seleciona após provar numerosas estirpes - que deve ser estável, e o rendimento e velocidade a que se produzem as mudanças não devem ser variáveis
2. Manutenção da atividade de um cultivo - uma vez obtido um cultivo satisfatório há que mantê-lo puro e ativo - pode ser através de transferências periódicas. O cultivo de reserva pode ser através de liofilização ou congelamento em nitrogênio líquido
3. Preparação de cultivos - feito com a cultura estoque mantida conservada ou com culturas isoladas na etapa seletiva : Cultivos bacterianos, Cultivos de leveduras, Cultivos de mofo ou Cultivos mistos
4. Atividade de um cultivo - se julga pela velocidade de seu crescimento e produção da substância

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS



Produção Microbiana de Ingredientes de Alimentos

Ingredientes	Função	Organismo
D-arabitol	açúcar	<i>Candida diddensis</i>
beta-caroteno	pigmento	<i>Blakeslae trispora</i>
ácido cítrico	acidulante	<i>Aspergillus niger</i>
diacetil	saborizante (manteiga)	<i>Leuconostoc cremosis</i>
ésteres de ácido graxo	fragrâncias de frutas	<i>Pseudomonas spp</i>
declactona	fragrâncias de pêssego	<i>Sporobolomyces odoros</i>
genariol	fragrâncias de rosa	<i>Kluyveromyces lactis</i>
ácido glutâmico	estimulante do sabor	<i>Corinebacterium glutamicum</i>
ácido láctico	acidulante	<i>Estreptococos e Bacilos</i>
lisina	aminoácido	<i>Corinebacterium glutamicum</i>
manitol	açúcar	<i>Torolopsis mannitofaciens</i>
nisina	antimicrobiano	<i>Streptococcus lactis</i>
6-pentil-2-pirona	fragrâncias de coco	<i>Trichoderma viride</i>
l-fenilalanina	precursor do aspartame	<i>Bacillus polymyxa</i>
prolina	aminoácido	<i>Serratia marcerscens</i>
polissacarídeos termoestáveis	espessante	<i>Argobacterium radiobacter</i>
vitamina B-12	vitamina	<i>Propionibacterium</i>
goma xantana	espessante	<i>Xanthomonas campestri</i>

Produção de biomassa microbiana/ Proteínas unicelulares

Proteína unicelular é aquela proveniente de células de microrganismos. Fungos filamentosos, leveduras, bactérias e algas são fontes de proteínas unicelulares. As leveduras tem sido preconizadas com mais frequência, contudo esta produção depende do tipo de substrato a ser

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

utilizado, disponibilidade de matéria prima, velocidade e multiplicação do organismo, toxicidade, digestibilidade e valor nutritivo do produto final.

Biomassa fúngica

1. Fungos filamentosos formadores de cogumelos comestíveis

- p.ex. *Agaricus campestris*, *Lentinus edodes* - cultivados utilizando-se diferentes substratos lignocelulósicos (bagaço de cana, palha de arroz, serragem, polpa de café, folha de mandioca, etc)
- extrato obtido de *Lentinus edodes* inibiu o desenvolvimento de tumores em ratos, em pesquisa realizada na Universidade de Hong Kong
- atualmente, desenvolvem-se estudos sobre proteína microbiana para consumo animal e do homem, a partir de resíduos agrícolas utilizados para crescimento fúngico.

2. Micoproteína ou proteína fúngica

- é produzida a partir do gênero *Fusarium*, e está sendo estudada como substituto de carne. É considerada uma proteína de elevada qualidade.

3. Levedura alimentícia

- a levedura é fonte de proteínas e vitaminas do complexo B e minerais. No estado seco, contém cerca de 50% de proteína de boa qualidade

Processo de produção de proteína unicelular

- preferência a material abundante, de baixo custo, ricos em carboidratos - resíduos industriais, de destilarias, de processamento de alimentos, soros de leite, resíduos lignocelulósicos de bagaço de cana, papéis velhos, etc
- consiste primeiramente, na transformação de hidratos de carbono da matéria-prima em matéria celular, com suplementação de sais de amônio e fósforo.
- na obtenção de proteína unicelular de leveduras, a conversão da matéria-prima em proteína é conduzida em fermentadores que são dotados de dispositivos para agitação e aeração, objetivando fornecer oxigênio que é essencial ao desenvolvimento dos microrganismos
- finalizada a fase de conversão, segue-se o processo de recuperação, que consiste em separar a massa celular dos outros componentes indesejáveis do meio de cultura, o que se consegue por processos de centrifugação, lavagem, filtração e secagem.

Produção de Inseticida Microbiano - Controle Biológico

A constatação dos efeitos dos pesticidas sobre o meio ambiente tem intensificado os esforços para se utilizar microrganismos como agentes biológicos, ao invés de defensivos químicos para o controle de pragas. Inseticidas microbianos dizem respeito a característica patogênica que alguns microrganismos apresentam para alguns insetos. Em cada aplicação, os microrganismos precisam ser dispersos no meio ambiente.

Alguns requerimentos específicos precisam ser preenchidos antes da utilização do microrganismo como inseticida microbiano :

1. facilidade para a produção em larga-escala;
2. a viabilidade do microrganismo precisa ser mantida;
3. o organismo não deve apresentar toxicidade ou patogenicidade a animais e plantas;

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

4. o organismo precisa apresentar menos custo que os agentes químicos

- bactérias, vírus, fungos, protozoários podem ser utilizados como inseticidas. Alguns deles são produzidos comercialmente em fermentações de larga-escala ou como hospedeiro de insetos
- atualmente, sabe-se que cerca de 400 espécies de fungos atacam insetos e ácaros, o que estimula estudos voltados para utilização desses fungos como micofungicidas, micoinseticidas e micoherbicidas
- o fungo *Metarhizium anisophae* é um inimigo natural da cigarrinha da folha, e pode parasitar aproximadamente 200 insetos hospedeiros diferentes, o que traz a possibilidade de sua utilização como único agente biológico controlador de diversas pragas
- mais de 650 vírus tem sido caracterizado como patógenos de plantas, e demonstram possibilidades para sua utilização como inseticidas biológicos.
- três bactérias, *Bacillus popilliae*, *B. moritae*, *B. thuringensis*, são comercialmente produzidas. *B. popilliae* é obtido diretamente de larvas infectadas, e as outras bactérias são cultivadas em processos de fermentação submersa.
- *B. thuringensis*, é a bactéria mais amplamente usada e é cultivada em um meio contendo amido, xarope de milho, caseína, extrato de levedura e sacarose. Após aproximadamente 30 horas de fermentação, a esporulação ocorre, acompanhado pela formação de proteínas extracelulares e intracelulares.
- *B. thuringensis* produz um cristal protéico intracelular, que apresenta elevada toxicidade, específica para larvas de certos insetos lepidópteros, mas inteiramente atóxico para animais vertebrados e plantas, após a ingestão do cristal pelo inseto, este é dissolvido no pH alcalino do intestino, inibindo o transporte de íons, provocando a morte do inseto.

Produção de Vacinas Bacterianas

Antígenos imunizantes - o cultivo extensivo de microrganismos para uso em vacinas pode ser encarado como um empreendimento industrial, embora não seja um processo de fermentação.

As vacinas, ou substâncias antigênicas, são de natureza protéica, previamente, elaborada e representada pelo próprio microrganismo, por frações dele ou por produtos de seu metabolismo. Todas as vacinas funcionam estimulando o organismo a produzir anticorpos, substâncias que farão a defesa do corpo contra a doença, provocando o desenvolvimento de imunidade, ou uma resistência específica.

São numerosas as doenças provocadas por bactérias, para as quais têm sido preparadas vacinas: tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch), meningite meningocócica (*Neisseria meningitidis*), tétano (*Clostridium tetani*) entre outras

Produção de Antibióticos

Antibióticos são produtos do metabolismo secundário que inibem o processo de crescimento de outros organismos, mesmo quando usados em baixas concentrações

A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser produzido industrialmente. Atualmente, aproximadamente 6000 dessas substâncias são conhecidas, no mínimo 91 são produzidas comercialmente por fermentação. Outros 46 antibióticos semi-sintéticos têm aplicações clínicas. Cloramfenicol e pirrolnitrina foram originalmente descobertos como compostos microbianos, mas agora são produzidos quimicamente em laboratórios.

Os grupos microbianos produtores de antibióticos:

- antibióticos são produzidos por bactérias e fungos
- nos fungos, apenas os antibióticos produzidos pelos fungos da divisão Ascomycotina e fungos imperfeitos são de importância prática. Apenas 10 dos antibióticos fúngicos conhecidos são

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

produzidos comercialmente, e apenas as penicilinas, cefalosporina C, griseofulvina e ácido fusídico são clinicamente importantes

- nas bactérias, existem alguns grupos taxonômicos importantes que produzem antibióticos. A grande variedade na estrutura e número de antibióticos é encontrado nos *Actinomicetes*, especialmente no gênero *Streptomyces*
- outro importante grupo de substâncias são os antibióticos peptídeos, produzidos pela bactéria do gênero *Bacillus*

As principais fases da produção comercial da penicilina (*P. chrysogenum*) são :

1. Preparação do inóculo;
2. Preparação e esterilização do meio;
3. Inoculação do meio no fermentador;
4. Aeração forçada com ar estéril durante a incubação;
5. Remoção do micélio após a fermentação;
6. Extração e purificação da penicilina

A produção da maioria dos outros antibióticos segue o mesmo plano geral. As principais diferenças se relacionam com o microrganismo, a composição do meio e o método de extração. Alguns fabricantes empregam o mesmo equipamento de fermentação para a produção de vários antibióticos diferentes.

Produção de etanol

Após a água, o álcool é o solvente mais comum, além de representar a matéria-prima de maior uso no laboratório e na indústria química.

Na biossíntese do etanol é empregado linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, que realizam a fermentação alcoólica, a partir de um carboidrato fermentável. É muito importante que a cultura de levedura possua um crescimento vigoroso e uma elevada tolerância ao etanol, apresentando assim a fermentação um grande rendimento final

O etanol é inibidor à altas concentrações, e a tolerância das leveduras é um ponto crítico para uma produção elevada deste metabólito primário. A tolerância ao etanol varia consideravelmente de acordo com as linhagens de leveduras. De modo geral, o crescimento cessa quando a produção atinge 5% de etanol (v/v), e a taxa de produção é reduzida a zero, na concentração de 6 a 10% de etanol (v/v)

A transformação bioquímica realizada pela *S. cerevisiae* é a seguinte:

Glicose --- enzimas da levedura --- 2 etanol + 2 CO₂

O etanol pode ser produzido a partir de qualquer carboidrato fermentável pela levedura: sacarose, sucos de frutas, milho, melaço, beterrabas, batatas, malte, cevada, aveia, centeio, arroz sorgo etc, (necessário hidrolisar os carboidratos complexos em açúcares simples fermentáveis, pelo uso de enzimas da cevada ou fúngicas, ou ainda pelo tratamento térmico do material acidificado). Material celulósico, como madeira e resíduos da fabricação da pasta de papel podem ser utilizados. Por causa da grande quantidade de resíduos de material celulósico disponível, a fermentação direta desses materiais quando hidrolisados por enzimas celulolíticas pode ser de grande importância econômica

Culturas mistas de *Clostridium thermocellum* e *C. thermosaccharolyticum* podem ser usadas. Hemiceluloses e celuloses são hidrolisadas em monossacarídeos (hexoses e pentoses) por essas bactérias e os monossacarídeos são fermentados diretamente a etanol

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

A produção de etanol é iniciada aerobicamente para produzir o máximo de biomassa. De modo geral, o processo envolve as seguintes etapas: (1) preparo do substrato; (2) correção do mosto (3) preparo do inóculo (4) fermentação; (3) destilação

Produção de ácidos orgânicos

1. Produção de Ácido Acético

Na indústria de alimentos, o grupo das bactérias acéticas é de grande importância na fabricação de vinagres (álcool ---- ácido acético)

Grupo das bactérias acéticas :

- família *Pseudomonadaceae*, bastonetes Gram-negativos, aeróbicas, móveis, apresentam ou não flagelo polar
- formam ácidos por oxidação incompleta de açúcares ou álcoois: (1) é formado o acetaldeído por oxidação; (2) acetaldeído é convertido a ácido acético. 75% do acetaldeído é convertido em ácido acético, e os outros 25% em etanol.
- são razoavelmente tolerantes às condições ácidas. Suportam pH < 4.0 (pH ótimo em torno de 5.0 a 6.0)
- ocorrem na superfície de plantas, flores e frutas. Flora secundária em matéria vegetal em decomposição. São bastante exigentes nutricionalmente
- principais diferenças que as distinguem do gênero *Pseudomonas*:
 - o toleram pH mais ácido
 - o apresenta menor atividade proteolítica
 - o motilidade limitada e não são pigmentadas (com exceção de *Glucanobacter oxydans* que produz um pigmento marrom).
- as bactérias acéticas podem ser divididas em 2 gêneros principais:
 - o *Gluconobacter* (oxidam a glicose a ácido glucônico) - *G. oxydans* : apresenta flagelos polares (3 -8); são consideradas suboxidativas
 - o *Acetobacter* - *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. peroxidans* : mais utilizadas comercialmente na produção de vinagre
- são contaminantes indesejáveis na fabricação de vinhos
- juntamente com as leveduras e as bactérias lácticas, as bactérias acéticas tem sido freqüentemente citadas como deteriorantes na indústria de bebidas
- o tipo de deterioração que eles produzem inclui sabores desagradáveis, crescimento limoso e formação de gás

Generalidades sobre a produção de vinagre:

- a produção do vinagre envolve dois tipos de alterações bioquímicas: (1) uma fermentação alcoólica de um carboidrato; (2) uma oxidação do álcool até ácido acético.
- existem diversos tipos de vinagres produzidos dependendo do tipo de material usado na fermentação alcoólica (sucos de frutas, xaropes contendo amiláceos hidrolisados).
- emprega-se uma fermentação por leveduras para a produção do álcool. A concentração alcoólica é ajustada entre 10 a 13% sendo então exposta às bactérias do ácido acético (um processo aeróbio), que vai oxidar a solução alcoólica até que se produza o vinagre na concentração desejada.

Com o aumento da produção de bebidas em embalagens plásticas, as bactérias acéticas não fermentativas tornaram-se mais importantes. Várias razões contribuíram para este fato entre elas a resistência de *Gluconobacter* a sanitizantes comumente empregados na indústria engarrafadora de bebidas, sua habilidade de crescer na presença de ácido ascórbico e benzoico, e os altos níveis que caracterizam as bebidas em recipientes plásticos

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

2. Produção de Ácido Cítrico

O acúmulo do ácido cítrico por alguns fungos foi descoberto por volta de 1893 quando Wehmer, descobriu que o *Citromyces* (hoje identificado como *Penicillium* sp) e *Mucor* possuíam a capacidade de acumular este ácido durante o seu cultivo. Atualmente, a fermentação industrial para a produção do citrato é conduzida utilizando uma única espécie de fungo: *Aspergillus niger*. A levedura oxidativa *Saccharomycopsis* (*Candida*) tem apresentado características interessantes, podendo ser considerada potencialmente importante.

Emprego do citrato:

- cerca de 70% da produção é utilizado pela indústria de alimentos e bebidas; 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias.
- na indústria de alimentos usa-se em larga escala como acidulante por apresentar sabor agradável, baixíssima toxicidade e alta solubilidade. Além disso, esse ácido tem capacidade de complexação com metais pesados como o ferro e o cobre. Essa propriedade tem conduzido a crescente utilização como estabilizante de óleos e gorduras para reduzir a sua oxidação catalisada por esses metais. Também, essa propriedade aliada ao baixo grau de corrosividade a certos metais, tem permitido seu uso na limpeza de caldeiras e instalações especiais.
- na indústria farmacêutica, o ácido cítrico é usado como estabilizante de ácido ascórbico por causa de sua ação quelante. Nos antiácidos e analgésicos efervescentes, o ácido cítrico é usado juntamente com carbonatos e bicarbonatos para gerar CO₂.
- sais de citrato, como citrato trissódico e citrato tripotássico são usados na medicina para evitar a coagulação do sangue e na indústria alimentícia como emulsificante para fabricação de certos produtos como o queijo.
- ésteres de ácido cítrico, como trietil, tributil e acetildibutil, são usados como plastificantes não tóxicos nas películas plásticas de embalagens de alimentos.

Bioquímica da produção do ácido cítrico: essencialmente a glicose é transformada em piruvato pela via glicolítica. O piruvato é transformado em acetil CoA, que entrará no ciclo de Krebs para a formação do citrato

Fonte de carboidrato para a produção de ácido cítrico: a presença de carboidrato prontamente metabolizável é essencial para uma boa produção de ácido cítrico. Maltose, sacarose, manose, glicose e frutose são os açúcares mais apropriados para a produção de ácido. Na prática, o ácido cítrico é produzido a partir de carboidrato purificado (sacarose) ou da fonte de carboidrato bruto, de preço mais conveniente, como melaço de cana de açúcar, melaço de beterraba, sacarose bruta, caldo de cana, e hidrolisado de amido.

A presença de metais como contaminantes dessas matérias-primas constitui o principal problema na fermentação cítrica. Além disso, em alguns produtos encontram-se substâncias inibidoras e/ou promotoras de crescimento, a maioria pouco conhecida ou analisada. Algumas técnicas são usadas para remover ou neutralizar a inibição por esses contaminantes: a adição de ferrocianato de potássio e metanol é bastante comum na prática.

3. Produção de Ácido Láctico

Para a produção do ácido láctico, são as bactérias homoláticas do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus*. A espécie escolhida depende do carboidrato disponível e da temperatura a ser empregada:

- *Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus*: temperatura na faixa de 45 - 50°C;
- *L. casei* e *Streptococcus lactis*: temperatura ao redor de 30°C;
- *L. pentosis*, *L. leishmanii*: temperatura acima de 30°C.

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Principais características das bactérias lácticas

São bactérias Gram +, microaerófilas, não esporuladas, usualmente não apresentam motilidade, são catalase-negativa, apresentam colônias pequenas e apimentadas

Nutricionalmente muito exigentes. Possuem habilidade biossintética limitada e necessitam de aminoácidos, vitaminas, purinas e pirimidinas. Necessitam para o crescimento em laboratório: meios ricos em peptonas e hidrolisados protéicos, extrato de levedura, vitaminas e nucleotídeos.

São bactérias acidófilas: toleram baixos valores de pH. Tolerância a pH: bastonetes: não crescem a pH maior que 6,0; pH ótimo para crescimento: 4,5; cocos: pH neutro

Quando crescem na presença de O₂, substâncias oxidantes tóxicas ao metabolismo são produzidas: peróxidos (H₂O₂), superóxidos (O⁻²), radical hidroxila (OH⁻)

Habitat dos cocos e bastonetes homofermentativos:

- o principal é o corpo dos animais de sangue quente
- animal - flora normal da pele e mucosas: orofaringe, trato gastrointestinal e trato genito-urinário (associado a patógenos, exclusivamente linhagens do gênero *Streptococcus*)
- vegetal - vivem em associação com vegetais e crescem às custas de nutrientes eliminados a partir da morte do vegetal;
- leite: acesso através da pele e mucosas do animal (forragem, vegetais), linhagens patogênicas provocam a mastite (*Streptococcus agalactiae*)

As bactérias lácticas podem ser divididas em dois subgrupos bioquímicos de acordo com os produtos formados a partir de glicose

1. Bactérias homofermentativas

São muito importantes e tem grande interesse na fabricação do ácido láctico. Os primeiros estágios da via metabólica da fermentação láctica são os mesmos da fermentação alcoólica, ou mais especificamente a via de Embden-Meyerhof ou via glicolítica. O intermediário importante para a formação do ácido láctico é o ácido pirúvico. No final da via glicolítica, o ácido pirúvico, sob a ação da enzima lactato desidrogenase dá origem ao ácido láctico

2. Bactérias heterofermentativas:

Fermentação da glicose por essas bactérias resultam em vários produtos. Enquanto as bactérias homofermentativas degradam a glicose através da via glicolítica, as heterofermentativas degradam a glicose através da via oxidativa das pentoses fosfato. Os compostos intermediários importantes na via heterofermentativa são o ácido pirúvico e o aldeído acético. O rendimento líquido em ATP: 2 moles / mol de glicose pela via homofermentativa e apenas 1 mol / mol de glicose pela via heterofermentativa.

Processo de obtenção do ácido láctico

Obtém-se o ácido láctico a partir de diversas matérias-primas, subprodutos ou resíduos da indústria alimentícia, como soro do queijo, melão, glicose de milho. Empregam-se, também, resíduos de elevada DBO (demanda bioquímica de oxigênio), como os das indústrias de papel e polpa de celulose, aglomerados que contêm polímeros de açúcar.

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Os substratos utilizados são principalmente a glicose, lactose e sacarose. Porém, substratos amiláceos como de milho, batata e mandioca podem ser empregadas, desde que pré-hidrolisados enzimaticamente.

A concentração em açúcares do mosto é ajustada na faixa de 5 a 20% de acordo com o microrganismo, a matéria-prima e o processo empregado.

pH - O pH, para propiciar elevado rendimento, deve-se situar nas proximidades da neutralidade ou na faixa levemente ácida. É importante manter o pH constante, pois conforme a acidez aumenta, ocorre uma inibição da fermentação.

Tempo de fermentação - a fermentação se completa entre 1 a 7 dias, mas a média é de 5 a 7 dias.

Rendimentos - a média é de 85 a 90% em relação ao açúcar consumido (fermentado). O ácido formado é uma mistura racêmica.

A utilização do ácido lático

- é usado em alimentos, em fermentações, produtos farmacêuticos, cosméticos e também na indústria química.
- na alimentação, é usado como acidulante em produtos de confeitaria, na fabricação de extratos, essências, sucos de frutas, refrigerantes e outros. É empregado, ainda, na conservação de carnes, de vegetais e de pescado.
- na indústria têxtil é usado como mordente para estampar a lã. Emprega-se, ainda, no preparo de couros e pele. Na fabricação de plástico, utiliza-se o ácido lático transparente, de qualidade superior.
- os lactatos são usados na indústria farmacêutica, de cosméticos e na alimentícia;
- os ésteres são usados principalmente na fabricação de tintas e vernizes, de plastificantes e também como solventes

Fermentação Láctica

As bactérias utilizadas industrialmente são as anaeróbias e microaerófilas, para a produção de ácido acético, lático, glucônico, propiônico e outros, ou para a produção de alimentos como queijos, picles, chucrutes, vinagres, leites fermentados e outros.

Os fungos também são usados na produção de ácidos por via fermentativa. Os principais ácidos são: cítrico, glucônico, fumárico, lático, gálico, ácidos graxos e outros.

As bactérias envolvidas nos processos para obtenção de ácidos são principalmente as do gênero *Acetobacter* e *Lactobacillus*.

As bactérias podem formar inúmeros ácidos diferentes. São, no entanto, de maior interesse econômico algumas das bactérias produtoras de ácido lático, ácido acético e de ácido propiônico.

Os ácidos são provenientes da degradação anaeróbica de glicídios por oxidação incompleta.

Importância das bactérias lácticas na indústria de alimentos

Obtenção de vegetais fermentados: picles, chucrute, azeitonas, forragem para gado.

Gênero *Leuconostoc* - produção de sabor no chucrute; lacticínios: iogurtes, leites acidificados, queijos, manteiga;

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Leuconostoc, *S. lactis*, *S. diacetylactis* e *L. cremoris*: são usados como fontes de flavorizantes na indústria de laticínios e são responsáveis pelas diferentes características conferidas à manteiga, queijos e iogurtes (produção de diacetil)

Carnes curadas: salames e outros embutidos;

Biopolímeros: espessantes; expensor plasmático (plasma para repor volume em grandes hemorragias).

Flavorizantes: produção de diacetil/acetona a partir do citrato no leite 1g/L.

Aspectos negativos da presença das bactérias ácido-láticas na indústria

- Produção de acidez e aromas indesejáveis (diacetil) em: vinhos, sucos, cervejas e outras bebidas destiladas: Ex. *Pediococcus pernicius* e *P. damnosus*, encontrados na cerveja.
- Deterioração de produtos cárneos, vegetais e frutas.
- A síntese de biopolímeros por *Leuconostoc mesenteroides*, consome sacarose: na indústria açucareira, reduzindo o rendimento e provocando o entupimento de filtros, bombas e tubulações.

4. Produção de Ácido Propiônico

Microorganismos : *Propionibacterium*

Matérias-primas : fonte de carbono - lactose, sacarose, glicose; fonte de nitrogênio - milhocina, peptona. Tiamina e riboflavina estimulam o crescimento das Bactérias Propiônicas

Processo : glicose -- glicólise --- ácido pirúvico ---- ácido succínico --- descarboxilação --- ácido propiônico

Produção de Aminoácidos

1. Produção de ácido glucônico

Muitos microrganismos podem sintetizar aminoácidos a partir de compostos nitrogenados inorgânicos. A taxa e a quantidade de síntese de alguns aminoácidos podem exceder as necessidades celulares para a síntese protéica, resultando na excreção dos mesmos para o meio ambiente.

Alguns microrganismos são capazes de produzir quantidades de aminoácidos (lisina, ácido glutâmico, triptofano) suficientes para justificar seu emprego comercial. Muitas espécies de microrganismos, especialmente bactérias e fungos, são capazes de produzir grandes quantidades de ácido glutâmico.

Espécies dos gêneros *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Brevibacterium* são usadas na produção industrial do ácido glutâmico (produzem no mínimo 30g de aminoácido/L de meio).

A produção e excreção do ácido glutâmico depende da permeabilidade celular. O aumento da permeabilidade da célula pode ser obtido das seguintes maneiras:

- Deficiência de biotina;
- Adição de ácidos graxos saturados ou derivados de ácidos graxos;
- Adição de ácido oléico em mutantes nutricionais (ácido oléico auxotrófico);
- Deficiência de glicerol para glicerol auxotróficos.

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- Adição de penicilina, na fase logarítmica de crescimento

Todas as linhagens produtoras de ácido glutâmico necessitam de biotina, coenzima essencial na síntese de ácidos graxos. Biotina > 5mg/L, aumenta a síntese de ácido oléico, o que resulta em uma membrana com alto conteúdo de fosfolípidos, originando células incapazes de excretar o ácido glutâmico formado (25-35mg de ácido glutâmico/mg massa seca) é acumulado intracelularmente.

O meio de cultura para produção de ácido glutâmico contém, em geral, um carboidrato, peptona, sais inorgânicos e biotina em uma concentração adequada. O ácido alfa-cetoglutarico, intermediário do ciclo de Krebs, é o precursor do ácido glutâmico. A conversão do ácido alfa-cetoglutarico até ácido glutâmico se realiza pela ação da desidrogenase glutâmica.

Um dos principais empregos do ácido glutâmico é como condimento e agente favorecedor de sabor, sob a forma de glutamato de sódio.

Produção de enzimas

Enzimas	Origem	Indústria	Aplicação
Amilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhizophus spp</i> , <i>Mucor rouxii</i>	Panificação	suplemento de farinha, preparação de massa, alimentos pré-cozinhados, elaboração de xaropes
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Cerveja	preparação de concentrados líquidos de café, clarificação sucos
Dextrano-sacarose	<i>Leuconostoc mens.</i>	Alimentar	dextrano para diversos usos
Glucosioxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Alimentar	eliminação da glicose dos sólidos do ovo
Invertase	<i>Sacharomyces cerevisae</i>	Alimentar	mel artificial
Lactase	<i>Sacharomyces fragilis</i>	Láctea	hidrólise da lactose
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizophus spp</i> , <i>Mucor spp</i>	Láctea	sabor ao queijo
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizophus spp</i> , <i>Penicillium</i>	Alimentar	clarificação de vinho e de sucos de frutas
Protease	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Cerveja, Panificação, Alimentar	impede que a cerveja se enturva ao esfriar, abranda as carnes
Enzimas parecidas à renina	<i>Mucor</i>	Alimentar	coalhada do leite para fabricação de queijo

Bioconversões ou Biotransformações

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

São processos nos quais microrganismos convertem um composto a produtos relacionados estruturalmente. Compreendem apenas uma ou poucas reações enzimáticas (é diferente de processos fermentativos que apresentam várias seqüências de reações).

- são usados comercialmente apenas quando as reações químicas convencionais são muito caras ou difíceis. Exemplos: transformações estereoseletivas, quando apenas um grupo de uma molécula, com vários grupos funcionais idênticos necessita ser modificado.
- a bioconversão, envolve o crescimento do organismo em grandes fermentadores, seguidos pela adição à um tempo apropriado de um composto químico a ser convertido
- O processo de bioconversão mais praticado é na produção de hormônios esteróides.

Bioconversão de esteróides - síntese de cortisona

- corticosteróides (cortisona) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH): usados com grande efeito no tratamento de artrite reumática.
- esteróides são importantes hormônios em animais, que regulam vários processos metabólicos. Podem ser obtidos de plantas e animais
- muitos microrganismos podem transformar esteróides, mas o grupo dos fungos são os mais importantes.
- alguns esteróides são usados na medicina humana: progesterona - ativo durante a gravidez; alguns esteróides são usados como sedativos, na terapia antitumores; cortisona - são antiinflamatória, artrite reumatóide, doenças da pele, alergias
- a transformação dos esteróides requer o crescimento de um microrganismo capaz de efetuar a modificação desejada, num meio apropriado e sob condições controladas. Após ter ocorrido o crescimento adiciona-se o esteróide à cultura e a transformação química se realiza durante uma incubação ulterior. Remove-se a massa do desenvolvimento microbiano, extraindo-se, então, o esteróide transformado

Transformação de esteróides por fungos:

- Redução de ligações duplas nas posições 4,5 e 16, 17 e redução de grupos cetonas. Ex. *Epicoccum oryzae*
- Desidrogenação de esteróides na posição 1,2. Ex. *Fusarium solani*
- Hidroxilação: é a transformação mais importante. Nas posições 11 e 17 são bastantes produtivas. Hidroxilação em mais de uma posição - progesterona nas posições 6 e 11, por *Rhizopus arrhizus*.
- Epoxidação: *Curvularia lunata*. Crescimento em meio mínimo, reduz problemas com extração do produto. No final do crescimento, o esteróide a ser adicionado, é dissolvido em pequenas quantidades de solvente (0.5-2g/L). Após 20-40 h, a extração é realizada com solvente clorofórmio

Exemplos de Bioconversões efetuadas por microrganismos

- Síntese da vitamina C (*Acetobacter suboxydans*; *A. xylinum*)
- Transformação de antibióticos, produzidos semi-sinteticamente. Exemplo: enzima acilase penicilina (fúngica) usada na produção de penicilina. Isomerização da glicose para produção de frutose (enzima glicose isomerase)
- Transformação de pesticidas poluentes de solos e efluentes : Gêneros envolvidos: *Arthrobacter*; *Phanerochaete chrysosporium*; *Pseudomonas cepacia*, *P. aeruginosa*, entre outros

*Fungos de Interesse Industrial

Os fungos influenciam a vida do homem participando de processos desejáveis ou prejudiciais.

Prof. Dr. Octávio Antônio Valsechi

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Os fungos encontram-se amplamente em todos os ecossistemas e habitats. Podem ser parasitas, simbioses, sendo, em sua grande parte, saprófitos. Crescem onde existe matéria orgânica disponível, viva ou morta, geralmente apreciando calor e umidade. Água, solo, troncos, folhas, frutos, sementes, excrementos, insetos, alimentos frescos e processados, têxteis e inúmeros outros produtos fabricados pelo homem constituem substratos para o desenvolvimento de fungos.

Os Fungos na Biotecnologia

Muitas espécies de fungos têm sido testadas e utilizadas para a produção de substâncias de interesse industrial ou médico:

O etanol, ácido cítrico, ácido glucônico, aminoácidos, vitaminas, nucleotídeos e polissacarídeos são exemplos de metabólitos primários produzidos por fungos, enquanto que os antibióticos constituem importantes metabólitos secundários.

Além da aplicação em indústrias de fermentação, novos aspectos biotecnológicos têm sido explorados, inclusive de caráter ambiental, ou seja, os fungos podem atuar como agentes benéficos à melhoria do meio ambiente: Tratamento de resíduos líquidos e biorremediação de solos poluídos; Mineralogia e biohidrometalurgia; Produção de biomassa, incluindo proteína comestível; Tecnologia de combustíveis, particularmente na solubilização de carvão; Emprego em controle biológico

Leveduras

As leveduras, são fungos como os bolores, mas se diferenciam deles por se apresentarem predominantemente sob forma unicelular. Por serem células mais simples, elas crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores. Uma levedura típica consta de células ovais, que se multiplicam assexuadamente comumente por brotamento ou emulação. A maioria das leveduras, não vive no solo mas adaptou-se a ambientes com alto teor de açúcares, tal como néctar das flores e a superfície de frutas.

As leveduras fermentativas vêm sendo exploradas pelo homem há milhares de anos, na produção de cerveja e do vinho e na fermentação do pão, embora, somente no século XIX tenha sido reconhecida a natureza biológica dos agentes responsáveis por estes processos.

O principal agente da fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, é uma levedura ascomicética.

Leveduras de interesse industrial

Saccharomyces cerevisiae, *S. calnsbergensis* - usadas na panificação, cerveja, vinhos, etc

S. fragilis, *S. lactis* - fermentam lactose (tratamento de resíduos); *S. rouffii*, *S. mellis* - osmofílicas - frutas secas, xaropes, geléias; *S. baillie* - fermentação de sucos (cítricos)

Torulopsis osmofílica - leite condensado; *Candida* produz grande quantidade de proteínas, ataca leite e derivados; *Rodotorula* - deterioração de pickles, chucrutes e carnes (cor vermelha ou amarelo) *Picchia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Thricosporum* - deterioração de pickles com produção de película, oxida o ácido acético e altera o sabor; *Debaryomyces* - carnes, queijo e salsichas

CAPÍTULO 5: Sanitificação, Controle e Inspeção de Alimentos

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

Higienização : limpeza e sanitificação. Limpeza - remoção de resíduos orgânicos e minerais, aderidos à superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras e sais minerais. Sanitificação - eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de saprófitas ou alteradores à nível seguro. A limpeza reduz a carga microbiana das superfícies mas não a nível satisfatório

Principais reações químicas para remoção de resíduos

Características dos resíduos :

Resíduo	Solubilidade	Remoção	Alteração pelo calor
Carboidratos	solúveis em água	fácil	caramelização
Gorduras	insolúveis em água solúveis em alcalinos solúveis por tensoativos	difícil	polimerização
Proteínas	insolúveis em água solúveis em alcalinos	difícil	desnaturação
Sais minerais monovalentes	solúveis em água solúveis em ácidos	difícil	difícil remoção
Sais minerais polivalentes	insolúveis em água solúveis em ácidos	difícil	difícil remoção

1. Resíduos Orgânicos

Os principais são as gorduras e proteínas. Para removê-los é necessário transformações químicas específicas como :

- Para a gordura : saponificação (formação de sabão - solúvel em água) e/ou emulsificação (mudança de polarização - tornando-a solúvel)
- Para as proteínas : solubilização

2. Resíduos Minerais

Para remoção empregam-se agentes complexantes e aplicação de soluções ácidas

Qualidade da Água

1. Aspectos Físicos :

- cor - ex. presença de íons férricos mancham materiais e afetam processos industriais
- turbidez - suspensão de materiais de qualquer natureza, ex. lama, areia
- sabores e odores - presença de ácido sulfúrico, metano, CO₂, matérias orgânicas e substâncias minerais por ex. são indesejáveis

2. Aspectos químicos

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

- dureza - presença de sais de cálcio e magnésio lixiviados pela água

Dureza	Quantidade de CaCO ₃ (mg/l)
água mole	até 50
água moderadamente dura	de 50 - 150
água dura	de 150 - 300
água muito dura	acima de 300

Pode ocorrer uma combinação de resíduos de alimentos, resíduos de detergentes e sais da dureza da água formando "pedras" na superfície dos equipamentos, onde pode se desenvolver microrganismos

- acidez e alcalinidade - a acidez total representa teores de CO₂ livres, ácidos minerais e orgânicos, e sais de ácidos fortes - são corrosivos para equipamentos. A alcalinidade representa teores de carbonatos, bicarbonatos, CaOH, Mg(OH), Fe(OH), Mn(OH)
- sílica - a presença de SiO₂ - de difícil remoção. Normal de 5-50 mg/l
- gases - CO₂ e O₂ são corrosivos
- ferro e manganês - provocam formação de depósitos e crostas, colore produtos

3. Aspectos Microbiológicos

Padrões normais para a água potável

turbidez	5 mg/l (máx)
odor	ausente
cor	20 (Pt/l-Hazen)
pH	6.5-8.5
dureza total	200 mg/l
acidez total	5-20 mg/l
alcalinidade total	10-50 mg/l
alcalinidade cáustica	ausente
oxigênio consumido	2 mg/l
nitritos	ausência
cloretos	250 mg/l
cloro residual	0.2 mg/l (mínimo)
fluoretos	1.0 mg/l
silicatos	ausência
sulfatos	250 mg/l
sólidos totais	1000 mg/l
cobre	3 mg/l
chumbo	0.1 mg/l

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

ferro	0.3 mg/l
manganês	0.1 mg/l
zinco	5 mg/l
fenóis	0.001 mg/l
contagem de aeróbios mesófilos	100 UFC/100 ml
coliformes totais (NMP)	ausente em 100 ml

Principais tipos de superfícies usadas na indústria de alimentos

- madeira - difícil higienizar
- aço carbono - usar detergente neutro
- estanho - não deve entrar em contato com alimentos
- concreto - danificado por alimentos ácidos e agentes de limpeza
- tinta - alguns são adequados à indústria de alimentos
- aço inoxidável - resiste à corrosão, fácil higienização, caro
- vidro
- borracha

Tipos e níveis de contaminação microbiológica

Em torno de 200 doenças podem ser veiculadas ao homem pelos alimentos. Os agentes etiológicos podem ser: bactérias, fungos, vírus, parasitas, agentes químicos e substâncias tóxicas de origem animal e vegetal

As bactérias são responsáveis por 70 % dos surtos e 90 % dos casos - 50% dos surtos ocorrem em serviços comunitários (restaurantes); 5% em alimentos industrializados; 15% em residências, na produção caseira de alimentos; 30% de origem desconhecida

Bacteriologia da Água

A água de beber e aquela usada para fins industriais podem proceder ou não da mesma origem. Devem cumprir as normas de saúde pública (não devem conter bactérias coliformes, num número de contaminação de águas residuais). No caso da água para indústria deve ainda obedecer alguns requisitos a mais, dependendo do alimento produzido. Às vezes certas águas que são consideradas potáveis não são adequadas para usar em certos alimentos :

- Na fabricação de manteiga e requeijão p.ex. é inadequada água que contenha microrganismos psicrófilos como *Pseudomonas* ou *Alcaligenes* - pela sua capacidade de atividade lipolítica, podendo originar produtos de oxidação
- Água dura não deve ser empregada em fabricação de cerveja, nem em envasados de leguminosas - causam odores anormais (responsáveis : ferro e manganês)
- no abastecimento de água - causa problemas nas indústrias o crescimento mucoso de bactérias féricas

Os resíduos das fábricas de produtos alimentícios contém ordinariamente uma grande variedade de produtos orgânicos, uns facilmente oxidáveis, e outros complexos e de difícil decomposição. A concentração dos desperdícios ou que contém matéria orgânica é expressa em termos de DBO (demanda bioquímica de oxigênio) - quantidade de O₂ utilizado pelos microrganismos aeróbios e compostos redutores na estabilização da matéria decomposta durante um tempo determinado a uma certa temperatura. Normalmente se utiliza um período de 5 dias a 20°C e o resultado se expressa em DBO de 5 dias :

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

ppm DBO de 5 dias X galões de desperdícios X 8,34 / 1000 = libras de DBO

Quando se joga resíduos na água com alto teor de DBO, ou seja matéria orgânica elevada, rapidamente são consumidos de 7 a 8 ppm de O₂ (água normal), p.ex. resíduos da indústria leiteira - em torno de DBO de 500 a 2000 ppm

Tipos de Tratamento

1. Tratamento Químico

Adiciona-se uma mistura de substâncias químicas para que sedimente ou flocule e que ao sedimentar leve junto uma grande parte dos materiais coloidais suspensos, entre eles as bactérias. Sais solúveis de alumínio e ferro são os mais usados

2. Tratamento Biológico e eliminação de desperdícios

diluição - das águas residuais com água corrente

irrigação - quando águas residuais se estendem sobre uma superfície considerável de solo de textura aberta

enlagunado - lagos artificiais com ou sem outros tratamentos

filtração - com filtros preparados de rochas

resíduos ativados - inocular as águas de despejo com resíduos de um lote prévio, aerando ativamente em tanques adequados

tanques anaeróbios - sedimentação, hidrólise, putrefação e fermentação, seguida de um tratamento aeróbio

Tipos de resíduos da indústria de alimentos

- indústria leiteira - conteúdo protéico elevado, grande quantidade de lactose e muitos microrganismos; em condições anaeróbicas se acidificam e seu tratamento resulta muito difícil (500 - 2000 DBO)
- fábrica de enlatados de frutas - resíduos ácidos (200 - 2100 DBO)
- fabricação de malte, cerveja, destilados, enlatados de milho e subprodutos - ricos em carboidratos e suscetíveis de acidificação em condições anaeróbicas (420 - 1200 DBO)
- resíduos ricos em proteínas - podem apodrecer em condições anaeróbicas (380 - 4700 DBO)
- fábrica de papel - águas contêm sulfitos o que dificulta sua decomposição por microrganismos

Microbiologia dos produtos alimentícios

A redução ao mínimo da contaminação microbiana e a conservação da qualidade dos produtos exige um exame de:

- (1) matérias - primas utilizadas;
- (2) devida limpeza;
- (3) higiene e sanitificação dos equipamentos;

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

(4) controle do mecanismo de conservação;

(5) supervisão dos processos de embalagens e armazenamento

A prática correta de fabricação (GMPs) são especificadas por três órgãos internacionais : 1. Departament of Health Education and Welfare; 2. Public Health Service; 3. Food and Drug Administration (FDA). São encontradas no Code of Federal Regulations, título 21, código 128.1 a 128.10

Existem seções dependentes das Nações Unidas que se ocupa do comércio Internacional de alimentos como :

FAO - produção de alimentos através dos sistemas mais adequados, em relação com a própria produção, elaboração, conservação e distribuição

OMS - mais associada com a saúde do consumidor e com a obtenção de alimentos com a necessária qualidade sanitária

UNICEF

Crítérios Microbiológicos que devem cumprir os alimentos

O objetivo fundamental perseguido ao estabelecer os padrões bacteriológicos dos alimentos é assegurar :

- 1.sua aceitabilidade desde o ponto de saúde pública (que determinarão enfermidades infecciosas ou intoxicações por alimentos)
- 2.que os alimentos sejam de uma qualidade satisfatória (matéria-prima de boa qualidade que não vá se deteriorar ao longo do processo)
- 3.que tenha um aspecto agradável (livre de sujeiras devido a matéria fecal, micélios, mofo, parasitas, etc)
- 4.que a capacidade de conservação seja a normal para o alimento de que se trate

Definições de Crítérios Microbiológicos

De acordo com órgãos responsáveis pela qualidade dos alimentos distinguem-se padrões, limites e especificações

Padrão Microbiológico - lei ou regulamento administrativo oficial, que estabelece o número máximo tolerável de microrganismos, determinado por métodos estipulados oficialmente. **Obrigatório**

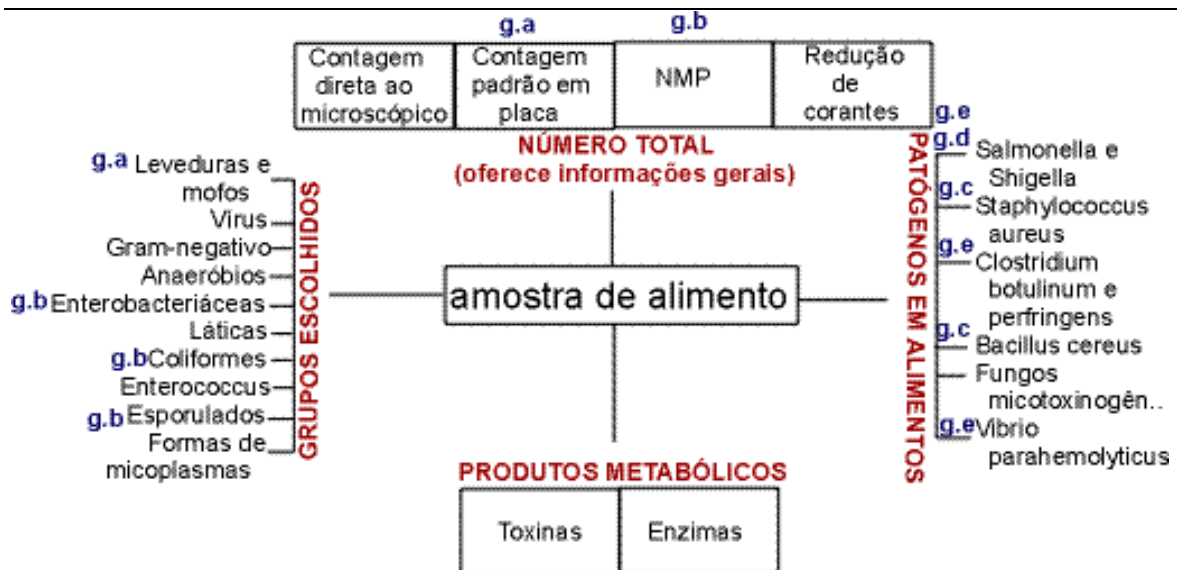
Limite Microbiológico Recomendável - limite máximo tolerável de microrganismos, determinado por métodos estipulados sugerido como aceitável para um determinado alimento. **De orientação**

Especificação Microbiológica - limite máximo tolerável de microrganismos, determinado por métodos estipulados de uso interno em uma firma para controlar a qualidade de seu produto

Métodos Microbiológicos Gerais

Dependendo da amostra de alimentos pode-se optar por um ou mais métodos que possa avaliar a qualidade microbiológica do alimento :

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS



Análise de risco e controle de pontos críticos - HACCP

Sistema preventivo de controle e riscos microbiológicos mediante análises cuidadosas dos ingredientes, produtos e processos e determinação dos componentes ou áreas que devem ser mantidas sob estrito controle para assegurar que o produto final atinja as especificações microbiológicas estabelecidas para o mesmo

O HACCP permite identificar as etapas críticas para a segurança do produto e onde concentrar os recursos técnicos para garantir que as operações críticas estejam sob controle. O método é integral e aplica-se a todas as fases do ciclo de produção e consumo dos alimentos e deve considerar a matéria-prima, os ingredientes, as etapas do processo e o abuso potencial do consumidor. O objetivo é contribuir para a segurança alimentar de forma a obter um alimento seguro e livre de contaminação.

A contaminação pode ser de origem : patogênica, toxigênica, de resíduos químicos, ou de matérias estranhos

Os principais indicadores são:

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- Contagem Total
- Coliformes Totais
- *Bacillus cereus*
- *Salmonella*
- *Clostridium perfringens*
- Fungos e leveduras

Estrutura do Sistema - O sistema é composto por cinco elementos :

1. Identificação e análise dos fatores de risco e perigos potenciais - serve para evidenciar a presença de riscos em todas as etapas do processo. O ciclo do alimento é analisado localizando-se as fontes de risco potencial e o momento específico de contaminação, determinando as possibilidades de sobrevivência dos microrganismos ou de sua permanência ou difusão

MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

2. Determinação dos pontos críticos de controle - requer conhecer o processo, estabelecendo seu fluxograma para através de uma descrição clara e simples, cobrindo todas as etapas de fabricação. O fluxograma deve conter informações tais como: matérias primas; etapas do processo; etapas de embalagem; condições do processo (tempo, temperatura); pH; Aa; contaminação biológica, química ou física; inativação de nutrientes essenciais; formação de substâncias inaceitáveis.
3. Seleção de critérios para o controle: especificar estes critérios e determinar limites críticos - os critérios são as especificações ou características físicas, químicas ou biológicas que requerem ser atingidas no processo para garantir a qualidade do alimento. Os mais comuns critérios microbiológicos são contagem total de mesófilos, coliformes totais e fecais, bolores e leveduras, detecção de Salmonella, etc, e seus limites devem ser fixados a partir das guias e padrões de legislação, literatura, experiência prática, levantamento prévio de dados e normas internas de cada empresa
4. Monitoramento dos pontos críticos e tomada de decisões caso os resultados indique que não estão sendo atingidos os parâmetros microbiológicos propostos. A folha de monitoramento deve incluir a etapa de processo, o perigo envolvido, a medida preventiva de controle, a variável envolvida, o limite crítico, a monitoração da variável, as medidas corretivas e o número de registro do formulário
5. Verificação de que sistema está funcionando conforme o planejado: estabelecendo ações corretivas, montando um sistema de registro de auditoria. Procura-se verificar se o sistema é operacional, se os pontos críticos de controle são ou não apropriados, se a monitoração foi efetivamente praticada

BIBLIOGRAFIA

Microbiology - An Introduction, 6a edition. Gerard J. Tortora Addison Wesley Longman, Inc. 1997. ISBN : 0-8053-8535-5 (book and cd)

Microbiologia de los Alimentos. James

Microbiology. Pelczar, Michael Joseph McGraw-Hill. V.1. 1990.

Tratado de Microbiologia. Isaac Roitman Editora Manole LTDA. 1988.

General Chemistry. 2a edition. Atkins, P.W. Scientific American Books. 1996. ISBN: 0-7167-2265-8