

Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"  
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

## Métodos analíticos para detecção e enumeração de microrganismos em alimentos: tradicionais e inovadores

Profa. Dra. Daniele F. Maffei

1

### Questionamentos

- ❖ Por que realizar análise microbiológica dos alimentos?
- ❖ Quais microrganismos ou grupos microbianos devem ser pesquisados?
- ❖ Quais características são importantes nos métodos de análise microbiológica?
- ❖ Quais as tendências na análise microbiológica de alimentos?

2

### Questionamentos

Por que realizar análise microbiológica dos alimentos?

- Assegurar a qualidade e segurança microbiológica das matérias primas e/ou ingredientes utilizados, bem como dos alimentos produzidos.
- Obter aprovação para realização de testes de análise sensorial de produtos.
- Identificar patógenos envolvidos em surtos de origem alimentar.

3

### Questionamentos

Quais micro-organismos ou grupos microbianos devem ser pesquisados?

Depende do contexto:

- Análises de rotina (micro-organismos indicadores).
- Validação dos processos de esterilização.
- Ocorrência de surtos (alimento envolvido, sintomatologia dos indivíduos afetados etc.).

4

### Questionamentos

Quais características são importantes nos métodos de análise microbiológica?

- Devem ser validados, aprovados e reconhecidos
- Econômicos
- Seletivos
- Reprodutíveis

5

### Questionamentos

Quais as tendências na análise microbiológica de alimentos?

- Métodos validados, aprovados e reconhecidos
- Redução de insumos necessários e resíduos gerados
- Custo x benefício
- Métodos sensíveis, rápidos e precisos

6

## Métodos de análise microbiológica

7

### Métodos de análise microbiológica

- ❖ Métodos tradicionais ou convencionais.
- ❖ Métodos rápidos ou alternativos.

8

### Métodos de análise microbiológica

#### Métodos tradicionais ou convencionais

##### Vantagens

- ✓ São métodos oficiais, validados e reconhecidos.
- ✓ Simplicidade e custo.
- ✓ Amplamente utilizados em laboratórios de pesquisa e de prestação de serviços.

9

### Métodos de análise microbiológica

#### Métodos tradicionais ou convencionais

##### Desvantagens

- ✓ Trabalhosos.
- ✓ Requerem muito material de laboratório.
- ✓ Recursos humanos treinados.
- ✓ Resultados demorados.

10

### Métodos de análise microbiológica

#### Métodos rápidos ou alternativos

##### Vantagens

- ✓ Simplificação do trabalho: prontos para uso, requerem menos suprimentos de laboratório.
- ✓ Requerem menos mão de obra.
- ✓ Resultados mais rápidos.
- ✓ Muitos já são validados e reconhecidos.

11

### Métodos de análise microbiológica

#### Métodos rápidos ou alternativos

##### Desvantagens

- ✓ Custo elevado?
- ✓ Métodos para detecção de patógenos – triagem, todo resultado positivo é apenas presuntivo, necessitando de confirmação pelos métodos convencionais de cultivo.

12

## Procedimentos para enumeração ou deteção de microrganismos

13

### Preparo da amostra para análise

- ✓ Registrar dados sobre a amostra (produto, solicitante, data e local de coleta/análise);
- ✓ Observar as condições de embalagem e desinfetá-la com álcool 70%;
- ✓ Homogeneizar o produto;
- ✓ Abrir assepticamente a embalagem (fluxo laminar ou bico de Bunsen, além de instrumentos e utensílios estéreis).

14

### Preparo da amostra para análise

- ✓ Retirar a unidade analítica (25 g ou mL)

Amostras líquidas (viscosidade ≤ leite) – utilizar uma pipeta;

Amostras sólidas ou líquidos concentrados – se for heterogênea, compor a unidade analítica com porções das diferentes camadas;

Carcaças de animais, embalagens – técnica do esfregão de superfície ("swabs" ou esponjas estéreis);

Carcaças pequenas, grãos, sementes e similares – técnica da lavagem superficial.

15

### Preparo da amostra para análise

- ✓ Homogeneização da amostra

Em geral, 25 g ou mL da amostra em 225 mL diluente estéril (diluição 1:10)

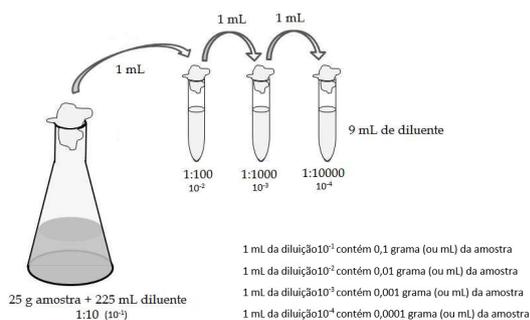
- solução peptona 0,1%
- solução salina 0,85%
- tampão fosfato pH 7,2
- solução salina peptonada

Pode ser utilizado liquidificador (não é ideal) ou *stomacher* (30-60 segundos)

16

### Preparo da amostra para análise - enumeração

Se o ensaio for de enumeração: diluição seriada da amostra.



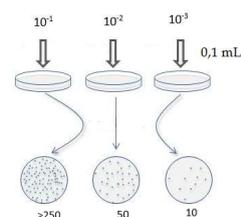
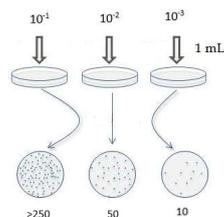
17

### Técnicas básicas de enumeração

Semeadura

Semeadura em profundidade

Semeadura em superfície



18

## Técnicas básicas de enumeração

### Contagem em placas

- ❖ Mede o número de células viáveis;
- ❖ São necessárias ao menos 24 h para que colônias visíveis sejam formadas;
- ❖ As contagens em placas consideram que cada bactéria viva cresce e se divide para produzir uma única colônia – UFC;
- ❖ Importante ter um número limitado de colônias na placa (25 – 250 colônias).



19

## Técnicas básicas de enumeração

### Método do Número Mais Provável (NMP)

- ✓ Permite estimar a densidade de micro-organismos viáveis presentes em uma amostra.
- ✓ Esta técnica não permite a contagem "fixa" de células viáveis ou de unidades formadoras de colônias, como acontece com a técnica de contagem em placas.

Recomendada quando é esperado um baixo número do micro-organismo alvo (<100/g ou mL) ou quando, devido ao processo tecnológico sofrido pelo alimento, as células presentes estejam lesadas fisiologicamente (células estressadas), não tendo portanto condições de formar colônias em meios sólidos seletivos.

20

## Técnicas básicas de enumeração

### Outros métodos para medida do crescimento microbiano

#### Membrana filtrante

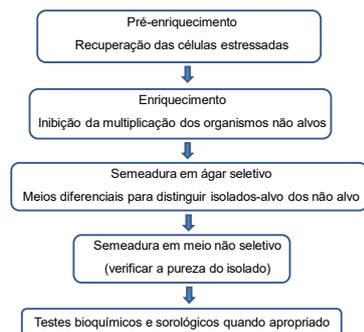
Método empregado quando a quantidade de bactérias é muito pequena (ex. corrente de água).

#### Contagem microscópica direta

Consiste em fazer um esfregaço com a amostra de alimento ou cultura microbiana sob uma lâmina de microscópio, corar com um corante apropriado, visualizar e contar as células com auxílio do microscópio (= rapidez, simplicidade).

21

## Técnicas básicas de detecção



22

## Principais métodos rápidos (alternativos) disponíveis no mercado

## Métodos rápidos (alternativos)

### Principais métodos rápidos (alternativos) disponíveis no mercado

- Meios de cultura modificados
- Sistemas prontos para uso
- Métodos bioquímicos miniaturizados
- Métodos imunológicos
- Métodos moleculares
- Outros

23

24

## Métodos rápidos (alternativos)

### Meios de cultura modificados

Ex. substrato cromogênico e fluorogênico.

Deteção simultânea qualitativa ou quantitativa de coliformes totais e *E. coli*

Contém o indicador cromogênico **ONPG** (orto-nitrofenil-galactopiranosídeo) e também o indicador fluorogênico **MUG** (4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucuronídeo);

Coliformes metabolizam o ONPG pela presença da enzima  $\beta$ -galactosidase, desenvolvendo a **cor amarela**;

*E. coli* metaboliza o MUG pela presença da enzima  $\beta$ -glucuronidase, desenvolvendo **fluorescência** quando exposto a luz UV.

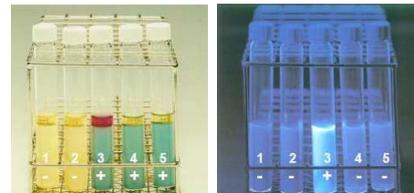
25

## Métodos rápidos (alternativos)

Água



Alimentos



26

## Métodos rápidos (alternativos)

### Sistemas prontos para uso

Ex. 3M™ Petrifilm™.

Sistema de meio de cultura pronto.

Disponíveis para contagem de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli*, estafilococos, bactérias lácticas etc.

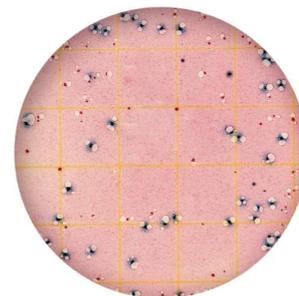
Ex. Deteção simultânea de coliformes totais e *E. coli* (24-48 h).

Coliformes confirmados - colônias **vermelhas** com bolhas de gás associadas.

*E. coli* confirmada - colônias **azuis** com bolhas de gás associadas.

27

## Métodos rápidos (alternativos)



28

## Métodos rápidos (alternativos)

### Métodos bioquímicos miniaturizados

Ex. sistema API® 20E (Biomérieux)

Versão miniaturizada de provas bioquímicas convencionais para identificação das *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativo.



29

## Métodos rápidos (alternativos)

### Métodos imunológicos

São métodos analíticos baseados em reações entre antígenos e anticorpos específicos para esses antígenos.

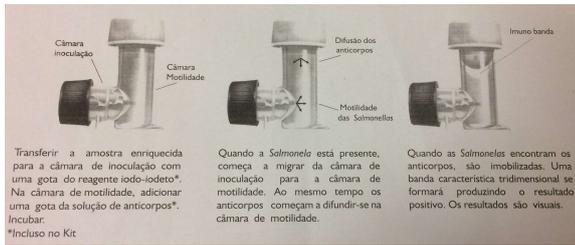
Ex. técnica imunoenzimática, imunofluorescência, imunomobilização, imunocromatográficas.

Ex. 1-2 Test® BioControl

Utiliza uma combinação de enriquecimento seletivo, meio de motilidade e anticorpos específicos para imunomobilização de *Salmonella*.

30

## Métodos rápidos (alternativos)



31

## Métodos rápidos (alternativos)

### Métodos moleculares



32

## Referências

FRANCO, B.G.G.M. *Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias*. Tese (Livre Docência) apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1994.

SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M. L. (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2015.

33