

HIGIENE

Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos

Fernando Leite Hoffmann (*)

A qualidade microbiológica dos alimentos está condicionada, primeiro, à quantidade e ao tipo de microrganismos inicialmente presentes (contaminação inicial) e depois à multiplicação destes germes no alimento.

A qualidade das matérias - primas e a higiene (de ambientes, manipuladores e superfícies) representam a contaminação inicial. O tipo de alimento e as condições ambientais regulam a multiplicação.

Os fatores inerentes ao alimento podem ser também chamados de *parâmetros intrínsecos*, como por exemplo, o pH e a atividade de água (Aa) e aqueles inerentes ao ambiente de *parâmetros extrínsecos*, como a temperatura, a umidade relativa (UR) e a presença de gases.

Tais fatores podem ser ótimos ou limitantes, interferindo sobremaneira na multiplicação de microrganismos, inclusive os patogênicos transmitidos por alimentos, causadores principalmente de infecções e intoxicações de origem alimentar, tais como:

Campylobacter jejuni

Coloração de Gram / morfologia: Gram negativo, bacilo curvo.

Exigência de oxigênio: microaerófilo obrigatório.

Temperatura de crescimento: 30°C (mínima), 42-45°C (ótima) e 47°C (máxima).

pH para multiplicação: 4,9 (mínimo), 6,5-7,5 (ótimo) e 9,5 (máximo).

Aa mínima para crescimento: > 0,97.

Máxima % de NaCl para multiplicação: 2,0.

Habitat: trato intestinal de animais domésticos de sangue quente.

Principais alimentos envolvidos: carne de aves, ovos, carne bovina, moluscos crus, mexilhões, ostras e leite cru.



Importância: um dos causadores de diarreia mais importante no mundo. Não se multiplica bem nos alimentos.

Dose de infecção / período de incubação: baixa ($5 \times 10^2/g$), 48 - 120 horas.

Sintomas: diarreia abundante (às vezes, sanguinolenta), dores abdominais, enxaqueca, fraqueza e febre.

Escherichia coli 0157:H7

Coloração de Gram / morfologia: Gram negativo, bacilo reto.

Exigência de oxigênio: facultativo.

Temperatura de crescimento: 10°C (mínima), 37°C (ótima) e 45°C (máxima).

pH para multiplicação: provavelmente 4,4-9,5 (geral para *E. coli*).

Aa mínima para crescimento: provavelmente 0,95 (geral para *E. coli*).

Máxima % de NaCl para multiplicação: provavelmente 6,0-8,0 (geral para *E. coli*).

Habitat: trato intestinal de bovinos.

Principais alimentos envolvidos: hambúrguer, leite cru e cidra de maçã.

Importância: provoca colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica.

Dose de infecção/período de incubação: desconhecida, 3 - 9 dias.

Sintomas: diarreia sanguinolenta.

Listeria monocytogenes

Coloração de Gram/morfologia: Gram positivo, bacilo curto.

Exigência de oxigênio: aeróbio ou microaerófilo.

Temperatura de crescimento: 0°C (mínima), 25-30°C (ótima) e 45°C (máxima).

pH para multiplicação: 4,3 (mínimo),

(*) Unesp - São José do Rio Preto

7,0-7,5 (ótimo) e 9,6 (máximo).

Aa mínima para crescimento: 0,83.

Máxima % de NaCl para multiplicação: 10-20.

Habitat: solo, vegetação, água e sedimentos marinhos.

Principais alimentos envolvidos: queijos, produtos cárneos, pescado e vegetais.

Importância: pode se multiplicar lentamente sob refrigeração, apresentando taxa de mortalidade de 30% nos infectados.

Dose de infecção/período de incubação: desconhecida, 8 dias - 3 meses.

Sintomas: desde enfermidade similar à gripe até meningite, podendo provocar aborto.

Salmonella sp

Coloração de Gram/morfologia: Gram negativo, bacilo curto.

Exigência de oxigênio: facultativo.

Temperatura de crescimento: 0 2,0°C (mínima), 37°C (ótima) e 45-46°C (máxima).

pH para multiplicação: 3,7 (mínimo), 6,5-7,5 (ótimo) e 9,5 (máximo).

Aa mínima para crescimento: 0,95.

Máxima % de NaCl para multiplicação: 8,0.

Habitat: trato intestinal de mamíferos, pássaros, anfíbios, répteis, homens e insetos.

Principais alimentos envolvidos: leite cru, produtos de laticínios, carne de aves, suínos, bovinos, vegetais e pescado, ovos, água e moluscos.

Importância: causa infecções devido à falta de higiene ou elaboração incorreta de alimentos, permitindo a multiplicação desta bactéria.

Dose de infecção/período de incubação: baixa ou alta concentração, dependendo do sorotipo, horas a 3 dias.

Sintomas: náuseas, vômitos, dores abdominal e de cabeça, calafrios, diarreia, febre, com duração de 2 - 3 dias (ou mais).

Staphylococcus aureus

Coloração de Gram/morfologia: Gram positivo, coco.

Exigência de oxigênio: facultativo.

Temperatura de crescimento: 5,6°C (mínima), 37°C (ótima) e 50°C (máxima).

pH para multiplicação: 4,0 (mínimo), 6,0-7,0 (ótimo) e 9,8 (máximo).

Aa mínima para crescimento: 0,83.

Máxima % de NaCl para multiplicação: 20,0.

Habitat: mucosas nasais e oral, pele e cabelo.

Principais alimentos envolvidos: pesca-



Cuidados na manipulação reduzem contaminação

do, leite cru, produtos de laticínios, principalmente queijos, produtos cárneos, massas, produtos de confeitaria, preparações à base de frango, ovos e outros, especialmente muito manipulados.

Importância: contamina os alimentos por manipulações incorretas e produz toxina termorresistente.

Dose de infecção/período de incubação: células - 10⁵ a 10⁸/g são necessárias para produzir toxina suficiente e toxina - 1 g de toxina/g de alimento, 2 - 6 horas.

Sintomas: náuseas, vômitos e diarreia aquosa, dor de cabeça, muscular e prostração.

Yersinia enterocolitica

Coloração de Gram/morfologia: Gram negativo, bacilo curto.

Exigência de oxigênio: facultativo.

Temperatura de crescimento: -1,3°C (mínima), 32-34°C (ótima) e 44°C (máxima).

pH para multiplicação: 3,0 (mínimo), 7,0-8,0 (ótimo) e 9,5 (máximo).

Aa mínima para crescimento: 0,95.

Máxima % de NaCl para multiplicação: 5,0-8,0.

Habitat: água, pequenos roedores, animais de estimação e suínos.

Principais alimentos envolvidos: leite cru, achocolatado, sorvetes, vegetais, carne de suínos e seus derivados e pescado.

Importância: aumento do número de casos declarados, pode se multiplicar sob refrigeração.

Dose de infecção/período de incubação: desconhecida, provavelmente alta (> 10⁶ / g), 1 - 10 dias.

Sintomas: diarreia, febre, vômitos, dor aguda na parte inferior direita do abdomen, simulando apendicite em crianças em idade escolar.

As bactérias, os bolores e as leveduras apresentam exigências nutricionais muito variadas mas, geralmente, encontram nos alimentos condições propícias para a sua multiplicação.

Em condições ideais, as bactérias são os microrganismos com maior velocidade de crescimento, podendo apresentar um tempo de geração (tg) em média de 20 minutos. Por isso, mesmo naqueles casos em que a contaminação inicial de um alimento é pequena, altas contagens poderão ser alcançadas em um breve espaço de tempo. Entretanto, tal velocidade não é constante, havendo acentuadas variações, que vão depender da fase de crescimento em que se encontram e das condições do ambiente. Os parâmetros intrínsecos e os extrínsecos, por conseguinte, determinam também a velocidade de multiplicação.

As leveduras, por sua vez, possuem um tempo de geração de 2 a 3 horas; portanto, superior ao das bactérias, sendo que os bolores (fungos filamentosos), multiplicam-se mais lentamente que as leveduras. Desta maneira, em um alimento que apresente condições para o desenvolvimento dos três grupos de microrganismos, as

bactérias serão dominantes e, portanto, serão as causadoras da deterioração. Por outro lado, leveduras e bolores serão importantes na deterioração daqueles alimentos que não ofereçam condições ao rápido crescimento das bactérias.

Fatores inerentes ao alimento

pH

O pH mede a concentração de H^+ de um alimento ou solução e é geralmente representado pela equação: $pH = \log 1 / [H^+]$. De acordo com a mesma, observa-se que quanto mais elevada a concentração de H^+ (caráter ácido), menor é o pH. Assim, o pH é menor em alimentos ácidos. O pH varia de 0 a 14, sendo 7 o valor que expressa a neutralidade.

É um fator de fundamental importância na limitação dos diferentes microrganismos capazes de se desenvolver no alimento, sendo proposta uma classificação prática dos alimentos em função do pH, dividindo-os em três grupos:

1. Alimentos pouco ácidos: apresentam pH 4,5,
2. Alimentos ácidos: possuem pH entre 4,0 e 4,5, e
3. Alimentos muito ácidos: apresentam pH 4,0.

O pH = 4,5 é muito importante em Microbiologia de Alimentos, pois abaixo desse valor não há o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* bem como, de forma geral, das bactérias patógenas.



Produção de massas: etapa crítica

A microbiota de alimentos pouco ácidos ($pH > 4,5$) é muito variada, havendo condições para o desenvolvimento da maioria das bactérias, inclusive as patogênicas, bolores e leveduras.

Nos alimentos ácidos ($pH 4,0$ a $4,5$), a microbiota é bem mais restrita, representada por bactérias lácticas e algumas esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. A grande maioria dos patógenos não se multiplica. Nesta faixa de pH, os bolores e as leveduras encontram-se em condições ótimas para seu desenvolvimento.

E em alimentos muito ácidos ($pH < 4,0$), a microbiota capaz de se desenvolver é

restrita apenas aos bolores e leveduras e, por vezes, bactérias lácticas e acéticas.

Temos, a seguir, alguns exemplos de alimentos de origem animal e vegetal e seu pH aproximado: atum (5,2 - 6,1), presunto (5,9 - 6,1), queijo (4,9 - 5,9), ameixa (2,8 - 4,6), batata (5,3 - 5,6) e tomate (4,2 - 4,3).

A Indústria de Alimentos utiliza o efeito do pH sobre os microrganismos para a preservação dos alimentos. Assim, são processados os alimentos fermentados, onde o ácido produzido pelos microrganismos causa o abaixamento do pH (ex.: leites, carnes e vegetais fermentados); ou ainda utilizando acidulantes como ácido cítrico, láctico, acético e outros, para, com isso, evitar o risco de deterioração ou atenuar os tratamentos térmicos, no caso de pickles, chucrute, champignon e palmitos.

Atividade de água (*Aa, aw*)

A atividade de água é também um parâmetro muito importante para o desenvolvimento microbiano.

Ela pode ser calculada pelas seguintes fórmulas:

$$Aa = (P1) / (Po), \text{ onde}$$

P1 = pressão de vapor d'água da solução (alimento) e

Po = pressão de vapor do solvente puro (água).

Ou $Aa = UR / 100$, onde UR = umidade relativa do alimento.

$$\text{Ou } Aa = n2 / n1 + n2, \text{ onde}$$

n1 = número de moles do soluto e

n_2 = número de moles do solvente, considerando-se uma solução ideal.

O valor absoluto da atividade de água dá uma indicação segura do conteúdo de água livre do alimento, sendo esta a única forma de água utilizada por parte dos microrganismos. As bactérias são normalmente mais exigentes quanto à disponibilidade de

água livre, seguidas pelas bolores e leveduras, sendo que, dentre estes últimos, algumas espécies se destacam pela elevada tolerância a baixa A_w . A possibilidade de alteração microbiana em alimentos acaba naqueles que apresentam A_w abaixo de 0,60, embora isso não signifique a destruição dos microrganismos.

Há alguns grupos de microrganismos particularmente resistentes a baixas A_w , como os:

Microrganismos osmofílicos: para se desenvolver precisam de ambiente com baixa A_w (como aquele proporcionado por produtos açucarados).

Microrganismos osmodúricos: suportam, mas não exigem ambientes com elevada concentração de açúcar.

Microrganismos halofílicos: necessitam, para se desenvolver, de ambientes com elevada concentração salina.

Microrganismos halodúricos: suportam ambientes com alta concentração de sal.

Microrganismos xerofílicos: possuem afinidade a ambientes secos.

A maioria das bactérias se desenvolve em A_w mínima de 0,91 - 0,88; das leveduras, em 0,88 e dos bolores, em 0,80.

A atividade de água nos alimentos pode variar de $> 0,98$ (carnes e pescados frescos, leite e outras bebidas, frutas e hortaliças frescas, hortaliças em salmoura enlatadas e frutas em calda enlatadas) a $< 0,60$ (doces, chocolate, mel, macarrões, batatas fritas, verduras desidratadas, ovos e leite em pó).



Linha de produção de frangos

Potencial Redox (Eh, O / R)

O potencial redox de um ambiente é medido em milivolts, podendo ser afetado por uma série de compostos. O oxigênio é o fator que mais contribui para o aumento do potencial redox de um alimento.

Os microrganismos variam no grau de sensibilidade ao potencial redox do meio de multiplicação e podem, de acordo com o Eh requerido, ser divididos em grupos, como:

Aeróbios: exigem Eh positivo (presença de oxigênio) e são representados pelos bolores, bactérias como a *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus*, algumas espécies de *Bacillus* e leveduras oxidativas.

Anaeróbios: requerem Eh negativo (ausência de oxigênio). O oxigênio chega a ser tóxico para a célula, porque gera peróxidos letais ao microrganismo. Os gêneros *Clostridium* e *Desulfotomaculum* compreendem espécies anaeróbias.

Facultativos: multiplicam-se em Eh positivo e negativo, sendo representados pelas leveduras (fermentativas), enterobactérias e *Bacillus*.

Microaerófilas: multiplicam-se melhor em Eh baixo. As bactérias lácticas são encontradas neste grupo.

Apresentam os seguintes Eh: carne moída (+ 300), queijo tipo Suíço (+ 300 a + 400) e suco de limão (+ 383).

Verifica-se, portanto, que este é um fator de importância a ser utilizado na preservação de alimentos e que determina também quais tipos de microrganismos irão se desenvolver em determinados alimentos. Por exemplo, pode-se

utilizar a exaustão, embalagens impermeáveis ao oxigênio, uso de vácuo, atmosfera com gases inertes, de aeração e carbonatação para se controlar os microrganismos aeróbios. Estes recursos são usados para queijos, vegetais, produtos cárneos e outros, a fim de evitar os mofos superficiais.

No caso dos enlatados, o ambiente anaeróbio favorece a multiplicação de bactérias esporuladas, anaeróbias ou facultativas.

Conteúdo de nutrientes

Os microrganismos variam as suas exigências quanto aos fatores de multiplicação e à capacidade de usar os diversos substratos que constituem os alimentos. Por exemplo:

a. **Fonte de carbono:** pode muitas vezes limitar a multiplicação dos microrganismos. Os polissacarídeos (carboidratos complexos), como o amido e a celulose, são utilizados diretamente por um número restrito de microrganismos. Os bolores são de particular interesse na deterioração de matérias - primas que contenham esses substratos.

Os óleos e as gorduras são "atacados" por microrganismos lipolíticos representados por muitos bolores, leveduras e bactérias (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* e outros); entretanto, um número elevado de microrganismos não possui a capacidade de se multiplicar nestes substratos.

b. **Fonte de nitrogênio:** além de outros compostos nitrogenados, é normalmente constituída pelos aminoácidos, nucleotídeos, peptídeos e proteínas.

c. **Fonte de vitamina:** os alimentos possuem geralmente as quantidades necessárias para o crescimento dos microrganismos; entretanto, as frutas, pobres em vitaminas do complexo B, desfavorecem a multiplicação de algumas bactérias.

d. **Sais minerais:** não são fatores limitantes nos alimentos.



Embutidos são sensíveis aos microorganismos

Constituintes antimicrobianos

Devido à presença de constituintes antimicrobianos, a estabilidade de alguns produtos de origem animal e vegetal, como os citados a seguir, ocorre na natureza.

a. Ovo: além de apresentar a proteção da casca, a clara possui a lisozima (muramidase), que destrói a parede celular das bactérias Gram positivas.

b. Amora: possui o ácido benzóico, que atua principalmente contra os fungos.

c. Cravo da Índia: possui óleos essenciais (principalmente o eugenol) e lipídeos com ação antimicrobiana.

d. Canela: possui o aldeído cinâmico.

e. Leite: mesmo sendo um produto altamente perecível, possui em sua composição substâncias antimicrobianas (lactenina e fator anti-coliformes), que mantém a estabilidade microbiana do produto nas 2 primeiras horas depois da ordenha.

Estruturas biológicas

Constituem também uma barreira ou obstáculo para o acesso dos microrganismos às partes perecíveis de alguns alimentos, ou seja, aquela que apresenta nutrientes, e portanto, que permite a multiplicação dos microrganismos e que são teoricamente estéreis. Tais estruturas podem ser representadas por cascas de sementes, nozes, arroz, peles e pelos de animais e ainda cascas ou películas de frutas.

Microbiota do alimento

A competição da microbiota do alimento também atua favorecendo ou inibindo algumas espécies ou grupos de microrganismos. As bactérias lácticas podem produzir ácido láctico, ou mesmo bacteriocinas, que inibem ou eliminam certos microrganismos patogênicos do alimento. De uma outra maneira, alguns tipos de leveduras podem consumir os ácidos orgânicos dos alimentos ácidos, fornecendo condições para a multiplicação daqueles microrganismos, que anteriormente tinham sua multiplicação inibida pela acidez.

O *Staphylococcus aureus* e o *Clostridium botulinum*, são maus competidores e não se desenvolvem adequadamente em alimentos que apresentem elevadas contagens de outros microrganismos (alimentos crus como carnes, pescados, etc).

Fatores inerentes ao ambiente

Temperatura

Dentre os fatores relacionados ao ambiente que podem atuar positiva ou negativamente sobre o crescimento dos microrganismos, a temperatura é um dos que mais afetam a viabilidade e a multiplicação microbiana. Apesar do crescimento microbiano ser possível em uma faixa de temperatura de - 8 até + 90C, a ótima da maioria dos patógenos é de 35C. A temperatura afeta a duração do período ou fase de latência, a velocidade de multiplicação, as exigências nutricionais e a composição química e enzimática das células.

Os efeitos letais do congelamento e do resfriamento (preservação pelo frio) dependem do microrganismo considerado e das condições de tempo e temperatura de armazenamento. Alguns microrganismos permanecem viáveis durante longos períodos de tempo em alimentos congelados.

A resistência a temperaturas mais elevadas depende, fundamentalmente, da característica do microrganismo. O *Staphylococcus aureus* é encontrado dentre os microrganismos patogênicos mais resistentes, visto que suas células resistem a 60°C por 15 minutos. Os microrganismos, de acordo com sua temperatura ótima de crescimento, classificam-se em: termófilos (55-75°C), mesófilos (30-45°C), psicrótróficos (25-30°C) e psicrófilos (12-15°C).

Umidade relativa (UR)

A umidade relativa interfere diretamente na atividade de água do alimento. Se armazenarmos um alimento de baixa Aa em ambiente com alta UR, a atividade de água do alimento aumentará, podendo sofrer deterioração por microrganismos.

O binômio UR/temperatura não pode ser desprezado, sendo que, no geral, quanto mais elevada a temperatura de estocagem, menor deverá ser a UR, sendo o inverso verdadeiro.

Presença de gases no meio - influência do dióxido de carbono

A armazenagem de alimentos em atmosfera contendo dióxido de carbono é conhecida também como estocagem em "atmosfera controlada", sendo utilizada, em muitos países, para frutas (maçãs e peras), provocando o retardo da putrefação, causada por fungos filamentosos. Tal efeito se deve, provavelmente, à inibição do etileno (que atua nas frutas como fator de envelhecimento) pelo gás carbônico. A concentração de dióxido de carbono não excede geralmente a 10%.

Tais atmosferas têm sido também muito utilizadas para estender o armazenamento de carnes, sendo as bactérias Gram negativas (*Pseudomonas*) mais sensíveis ao gás carbônico do que as Gram positivas, ou seja, as bactérias lácticas e as anaeróbias são mais resistentes.

Certos vegetais, principalmente as fru-



Processos artesanais têm maiores riscos

tas, são preservados em atmosfera contendo ozônio (2 - 3 p.p.m.), não sendo recomendado a sua utilização em alimentos com elevado teor lipídico, pois poderá acelerar a rancidez. Tanto o ozônio como o gás carbônico são eficientes para retardar as alterações superficiais em carnes estocadas por período longo.

Teoria dos obstáculos ou barreiras

A estabilidade e a segurança da maioria dos alimentos estão baseadas em muitos fatores, que têm como objetivo evitar a multiplicação dos microrganismos, impedindo a deterioração e a veiculação de diferentes moléstias. As interações entre os fatores intrínsecos e os extrínsecos originaram, portanto, o conceito dos obstáculos (barreiras) de Leistner. Os obstáculos normalmente considerados na conservação dos alimentos, são: temperatura (elevada ou baixa), atividade de água (Aa), pH (acidificação), potencial redox, conservantes (nitritos, sorbatos e sulfitos), atmosfera modificada e microrganismos competitivos (bactérias lácticas e produtos de seu metabolismo). A atuação sinérgica desses fatores melhora a estabilidade (aumento da vida útil) e, conseqüentemente, a qualidade do alimento, tomando-o inócuo à saúde do consumidor.

Bibliografia

DOYLE, M.P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York, Marcel Dekker, 1989.
DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE,

T.J. eds. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, D.C., ASM Press, 1997. 768 p.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza, Acribia, 1992. 804 p.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de alimentos. *In: Tratado de microbiologia*. São Paulo, Manole, 1987. 186 p.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that causes diarrhoea enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic and enteroadherent. **Journal Infections Disease**, U.S.A., v. 155, p. 377 - 389, 1987.

MORTIMORE, S. & WALLACE, C. **HACCP: enfoque prático**. Zaragoza, Acribia, 1996. 291 p.

PRICE, R.J. **Compendium of fish and fishery product processing methods, hazards and controls**. National Seafood HACCP Alliance for Training and Education. University of California Davis, 1997.

RYAN, K.J. & FALKOW, S. Enterobacteriaceae. *In: Sherris Medical Microbiology: a introduction to infections diseases*. 3a ed. U.S.A., Prentice Hall, 1994. 890 p.

SENAI - DN. **Elementos de apoio para o sistema APPCC**. Brasília, SENAI - Departamento Nacional, 1999. 371 p. (Série Qualidade e Segurança Alimentar). Projeto APPCC. Convênio CNI / SENAI / SEBRAE.