

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Curso de Medicina Veterinária

DISCIPLINA DE HIGIENE E SEGURANÇA DOS ALIMENTOS (ZMV1354)
Docentes Responsáveis: Profa. Dra. Ana Maria C. Vidal

ROTEIRO DE AULA PRÁTICA

1) PREPARO DA AMOSTRA COLETADA

A coleta de amostras para a avaliação de lotes de alimentos deve obedecer a planos de amostragem que permitam tomar decisões a respeito do destino dos lotes. Deve-se selecionar o plano de amostragem adequado a cada tipo de produto e levar em consideração o tipo de amostra e processo utilizado, fabricante e data de fabricação, solicitante da análise, data e local de coleta da amostra, e a razão da análise.

Procedimento

Retirada da amostra

Todo o material a ser utilizado para a retirada da amostra deverá estar estéril, seja por calor seco (estufa a 180°C/2 horas), seja por calor úmido (autoclave a 121°C/15 min.) ou por flambagem.

Toda a operação de retirada de amostra deve ser efetuada, preferencialmente, dentro de uma capela de fluxo laminar, ou próximo de um bico de Bunsen com a chama a meia altura.

As embalagens devem ser desinfetadas antes de sua abertura que deverá ocorrer de maneira asséptica. Amostras de alimentos líquidos devem ser retiradas com pipeta estéril, e os alimentos sólidos ou semi-sólidos devem ser pesados assepticamente.

Preparo das diluições

No preparo das diluições sucessivas ou decimais, será utilizada a solução de água peptonada a 0,1% como diluente. Para a obtenção da diluição inicial (10^{-1}), procede-se do seguinte modo:

- Retirar assepticamente porções de 25g ou 25mL da amostra, colocando-se em homogeneizadores esterilizados;
- Adicionar 225mL da solução de água peptonada;
- Homogeneizar por alguns minutos em velocidade reduzida, para não danificar as células microbianas que possam existir.

A diluição 10^{-2} é feita retirando-se 1mL da diluição inicial (10^{-1}) e colocando-se em 9mL do mesmo diluente. Realizar o mesmo procedimento para as diluições seguintes até a diluição desejada, conforme descrito na Parte A da Figura 1.

2) DETERMINAÇÃO DE MESÓFILOS

Procedimento – Plaqueamento em profundidade (Parte B da Figura 1)

- Preparar a amostra e as diluições conforme descrito no item 1;
- Pipetar alíquotas de 1mL de cada diluição em placas de Petri;
- Adicionar a cada placa 15-20mL de ágar padrão para contagem (PCA), previamente fundido e resfriado a 45°C;
- Homogeneizar com movimentos suaves, em forma de oito (cerca de 10 vezes) e deixar à temperatura ambiente até a completa solidificação do ágar;
- Após a solidificação, incubar as placas em posição invertida a 35°C por 48 horas.

3) DETERMINAÇÃO DE PSICOTRÓFICOS

Procedimento – Plaqueamento em superfície (Parte B da Figura 1)

- Preparar a amostra e as diluições conforme descrito no item 1;
- Pipetar alíquotas de 0,1mL de cada diluição em placas de Petri contendo de 15-20mL do ágar PCA previamente solidificado;
- Espalhar o inóculo com a ajuda de uma alça de Drigalski;
- Incubar as placas em posição invertida a 7°C por 10 dias ou 10°C por 7 dias.

4) DETERMINAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS

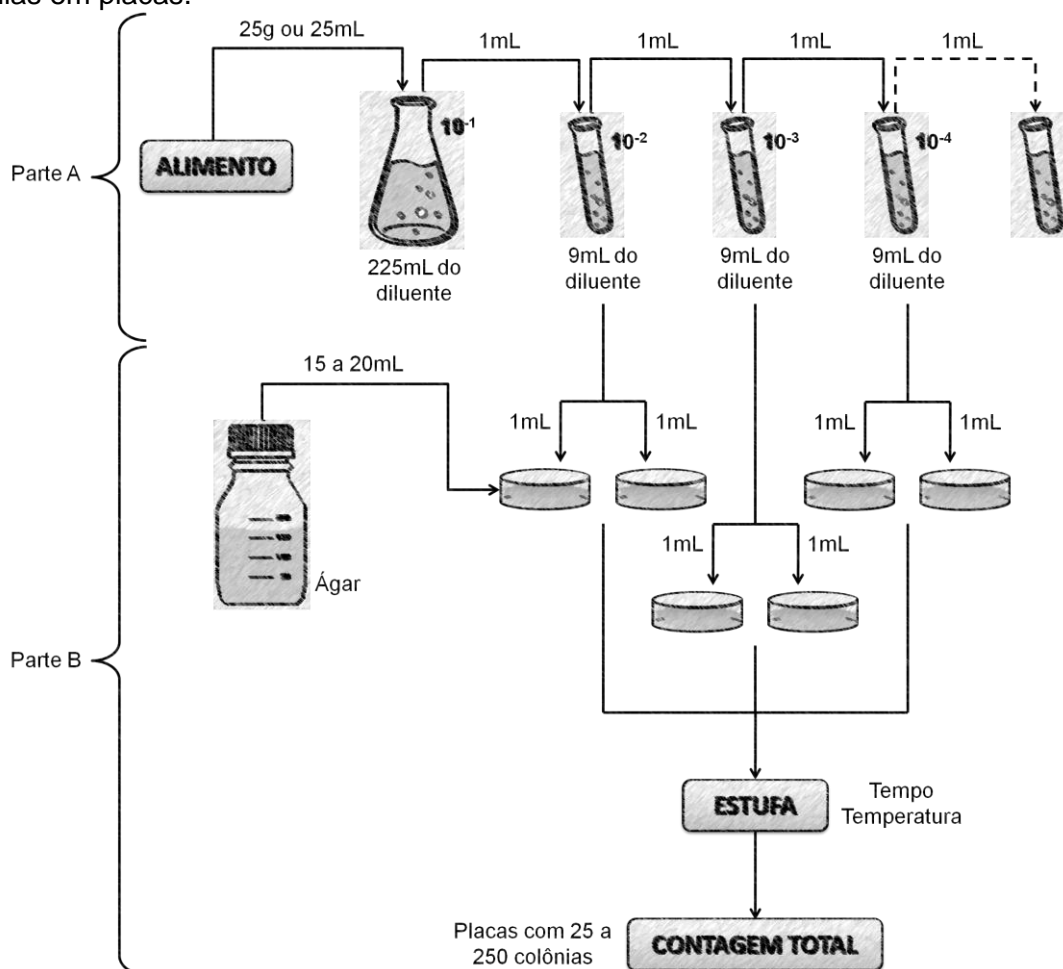
Procedimento – Plaqueamento em superfície (Parte B da Figura 1)

- Preparar a amostra e as diluições seriadas conforme descrito no item 1;
- Pipetar alíquotas de 0,1mL de cada diluição em placas de Petri contendo de 15-20mL do ágar dextrose batata (PDA) acidificado com ácido tartárico 10% previamente solidificado;
- Espalhar o inóculo com a ajuda de uma alça de Drigalski;
- Incubar as placas em posição invertida a 25°C por 3 a 5 dias.

RESULTADOS PARA OS ITENS 2, 3 E 4

Transcorrido o tempo de incubação, considerar para contagem somente as placas com a diluição que apresentarem de 25 a 250 UFC. Multiplicar a média aritmética das mesmas pelo respectivo fator de diluição e expressar o resultado em unidades formadoras de colônias por grama ou volume de amostra (UFC/g ou mL).

Figura 1. Procedimento ilustrativo para preparo de diluições e contagem de unidades formadoras de colônias em placas.



5) DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES

Procedimento (Figura 2)

Teste presuntivo:

- Retirar assepticamente 25g ou 25mL da amostra e preparar as diluições sucessivas descritas no item 1;
- Pipetar alíquotas de 1mL de cada diluição para uma série de três tubos com 10mL de caldo lauril sulfato triptose (LST) com tubos de Durham;
- Homogeneizar e incubar os tubos a 35°C por 24 horas e observar se há crescimento com produção de gás (tubos positivos);
- Anotar os tubos com produção de gás (tubos positivos);

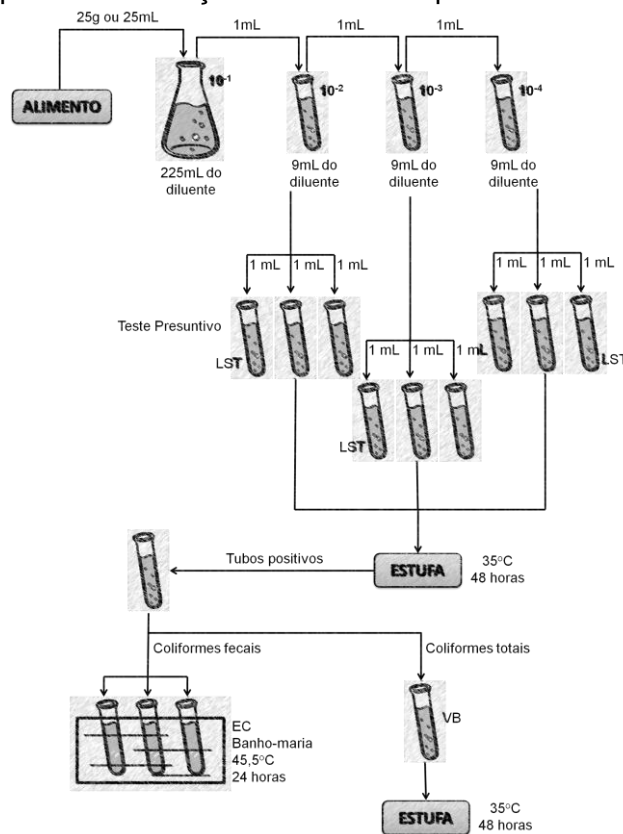
Teste confirmativo:

- De cada tubo de caldo LST positivo, transferir 1mL para 3 tubos de caldo verde brilhante bile (VB);
- Incubar em estufa a 35°C por 24 a 48 horas;
- Considerar positivos os tubos com produção de gás no tubo de Durham;
- Verificar na Tabela do NMP o número correspondente e expressar o resultado em NMP de coliformes totais por grama ou mL.

Coliformes termotolerantes:

- De cada tubo de caldo LST positivo, transferir 1 mL para 3 tubos de caldo *E. coli* (EC);
- Incubar em banho-maria a 45,5°C por 24 horas;
- Considerar positivos os tubos com produção de gás no tubo de Durham;
- Verificar na Tabela do NMP o número correspondente e expressar o resultado em NMP de coliformes termotolerantes por grama ou mL.

Figura 2. Procedimento para determinação de coliformes pela técnica do número mais provável.



6) DETERMINAÇÃO DE *Salmonella* spp.

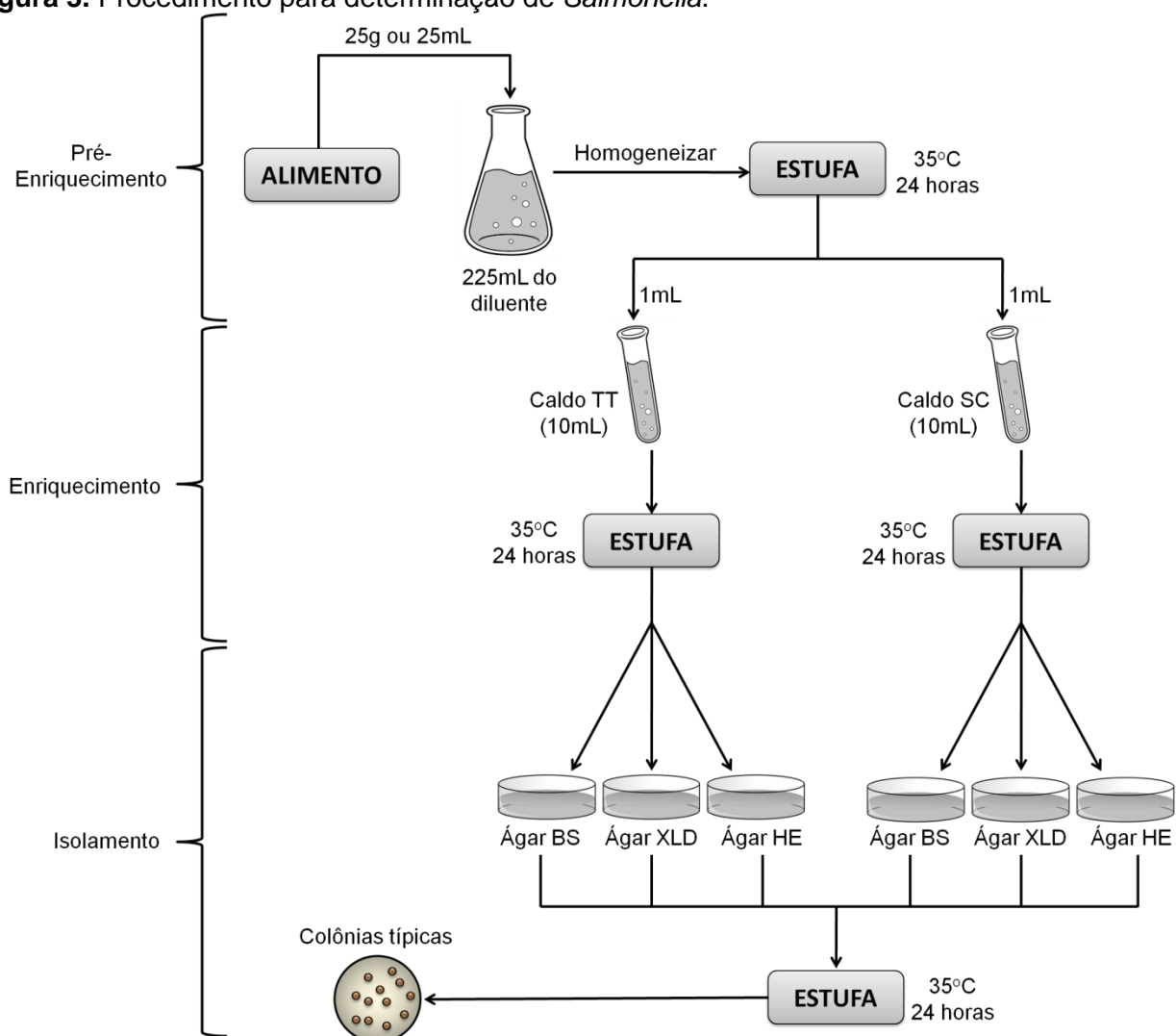
Procedimento (Figura3)

Pré-enriquecimento: retirar assepticamente 25g ou 25mL da amostra e adicionar 225mL de solução de água peptonada a 0,1%. Homogeneizar e incubar a 35°C por 24 horas;

Enriquecimento seletivo: agitar delicadamente o frasco e transferir alíquotas de 1mL para 10mL de caldo selenito cistina (SC) e para 10mL de caldo tetrationato (TT). Incubar a 42°C por 24 horas;

Plaqueamento diferencial: agitar os tubos e, com o auxílio da alça de platina, estriar uma alçada do caldo TT em placas contendo ágar entérico de Hectoen (HE), ágar bismuto sulfito (BS) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). Repetir esse procedimento com o caldo SC. Incubar as placas invertidas a 35°C por 24 horas e verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*.

Figura 3. Procedimento para determinação de *Salmonella*.

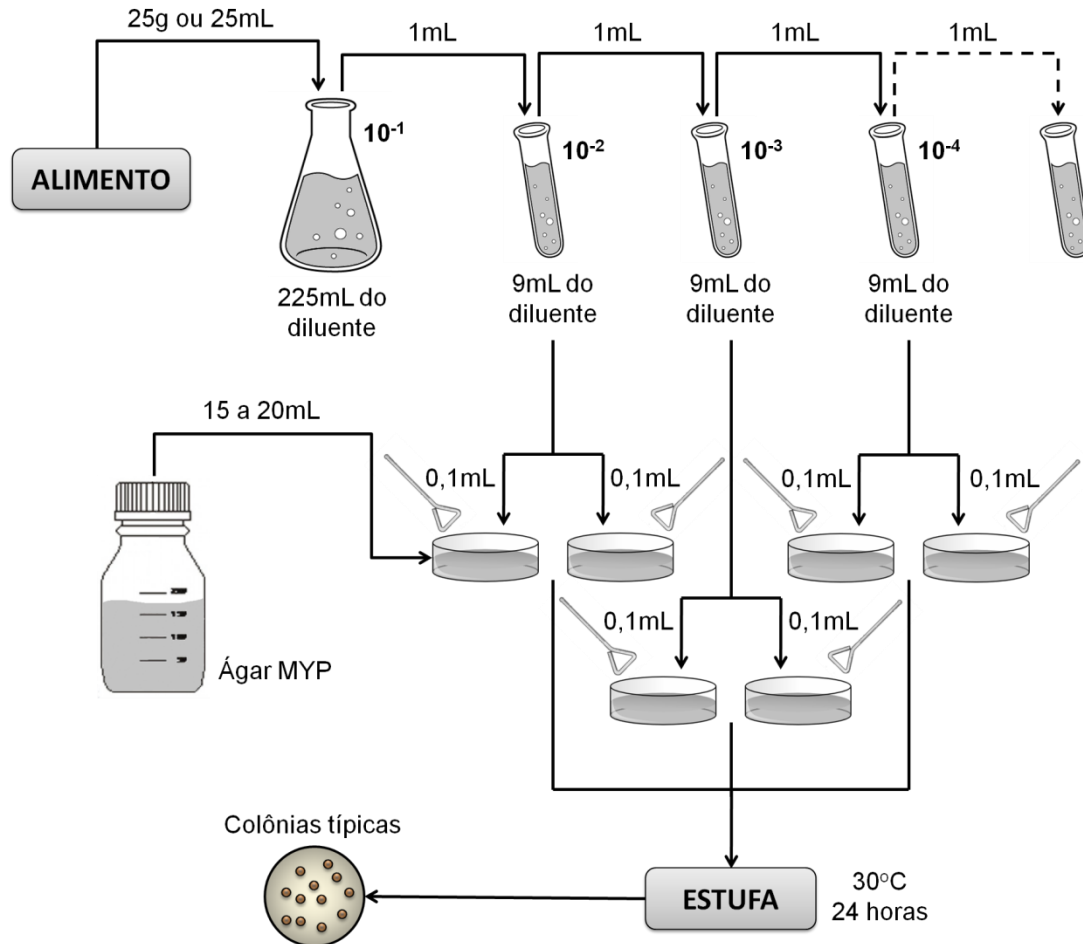


7) DETERMINAÇÃO DE *Bacillus cereus*

Procedimento (Figura 4)

- Retirar 25g ou 25mL da amostra e preparar as diluições sucessivas;
- Pipetar, de cada diluição, alíquotas de 0,1mL e colocar nas placas (previamente preparadas) contendo de 15 a 20mL de ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP);
- Espalhar o inóculo com a alça de Drigalski e incubar as placas na posição invertida a 30°C por 24 horas;
- Transcorrido esse tempo, selecionar as placas com 25 a 250 colônias e contar as colônias típicas de *B. cereus*.

Figura 4. Procedimento do teste para determinação de *B. cereus*.

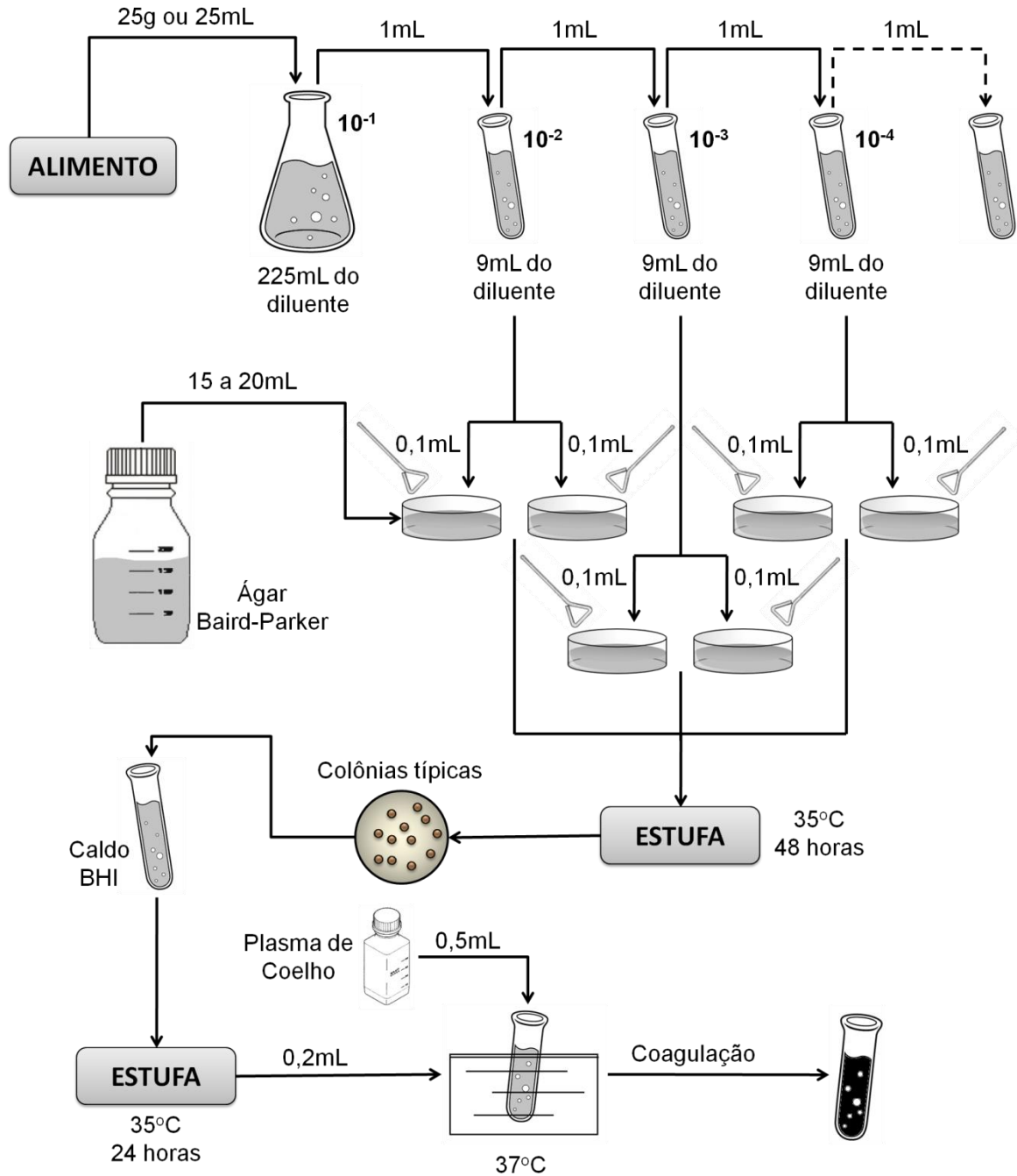


8) DETERMINAÇÃO DE *Staphylococcus* spp.

Procedimento (Figura 5)

- Retirar assepticamente 25g ou 25mL da amostra e preparar as diluições sucessivas;
- Retirar de cada diluição, alíquotas de 0,1mL e colocá-las nas placas de Petri previamente preparadas com 15 a 20mL do ágar Baird-Parker (BP) já solidificado;
- Fazer o espalhamento do inóculo na placa com auxílio de uma alça de Drigalski;
- Incubar, invertendo-se as placas, a 35°C por 48 horas;
- Transcorrido esse tempo, verificar as características das colônias típicas

Figura 5. Procedimento para determinação de *S. aureus*.

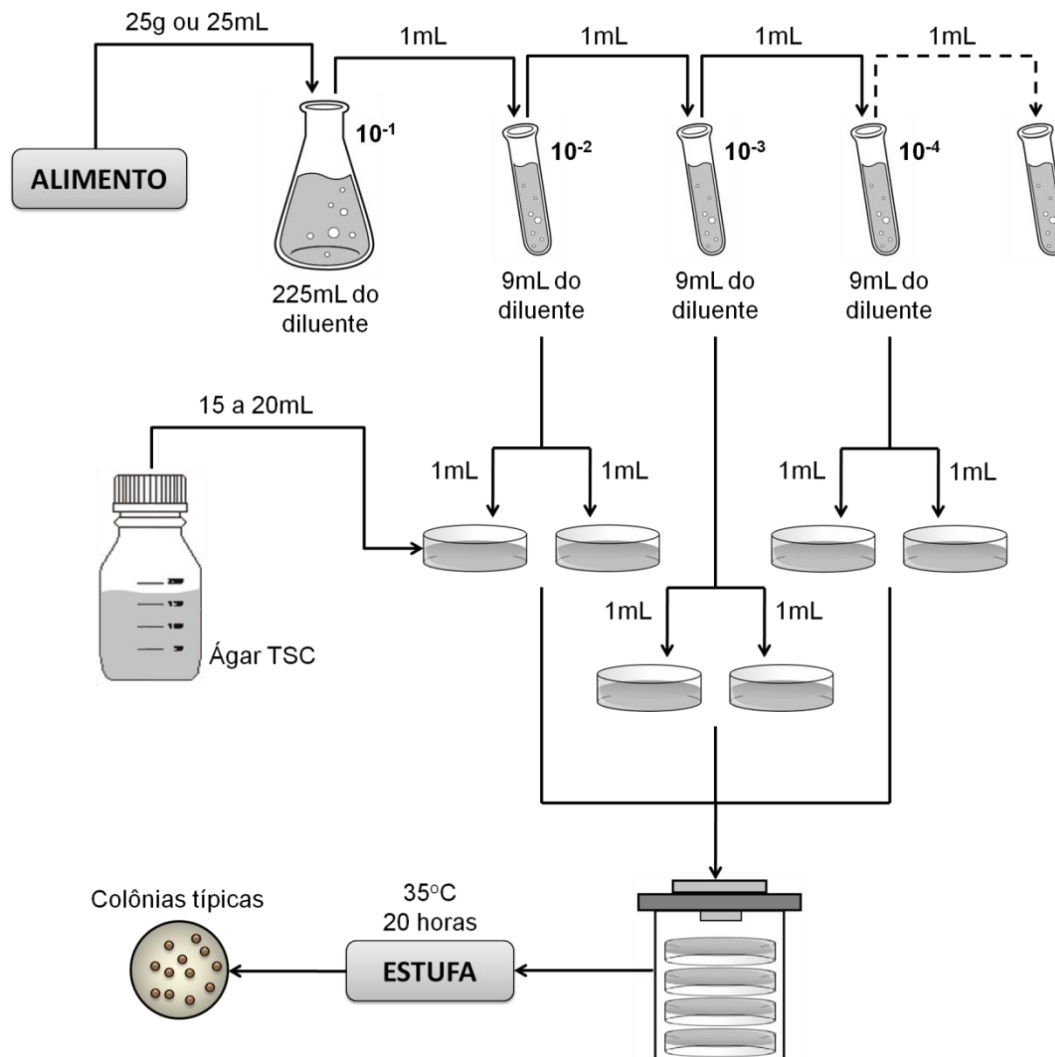


9) DETERMINAÇÃO DE CLOSTRÍDIOS

Procedimento

- Retirar assepticamente 25g ou 25mL da amostra e preparar as diluições sucessivas;
- Pipetar alíquotas de 1mL de cada diluição em placas de Petri e adicionar a cada placa 15-20mL do ágar triptose sulfato cicloserina (TSC) com sobrecamada;
- Homogeneizar com movimentos suaves em forma de oito, e permitir sua completa solidificação;
- Incubar as placas, sem inverter, a 35°C por 20 horas em atmosfera anaeróbia;
- Selecionar as placas com 25 a 250 colônias e contar o número de colônias típicas de *C. perfringens* (negras).

Figura 6. Procedimento para determinação de *C. perfringens*.



REFERÊNCIAS

- HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. Vol.1. São Paulo: Fontes Comunicações e Editora, 1998. 66p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.
- SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995. 159p.
- FDA – U. S. Food and Drug Administration, 2009. Disponível em: <www.fda.gov>. Acesso em: 28 julho 2011.
- GRANUM, P.E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v.157, p.223-228, 1997.