

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

Avaliação da qualidade dos alimentos: critérios microbiológicos e planos de amostragem

Dra. Juliana Galvão

1

Introdução

Entre os vários parâmetros que indicam a qualidade e a inocuidade dos alimentos, os que definem as suas características microbiológicas são extremamente importantes.

Estas características fornecem informações sobre as condições de produção, processamento, armazenamento, distribuição e vida útil, além dos riscos à saúde dos consumidores.



Introdução

Perigo x Risco Microbiológico

Perigo: agente (micro-organismo ou toxina microbiana) como causa potencial de dano à saúde humana.



Risco: probabilidade de ocorrência de dano e gravidade desse dano como consequência da ação de um perigo.



5

Planos de amostragem

x

Métodos analíticos

2

Introdução

Perigo x Risco



4

Introdução

Analisar os alimentos no final da linha de produção (teste do produto final) – prática padrão na indústria alimentícia há décadas.

No entanto, pouca atenção quanto a avaliação estatística desses dados.

Para que a análise microbiológica forneça o julgamento correto sobre o produto avaliado: os critérios de avaliação são fundamentais.

6

Introdução

Como são definidos os critérios para avaliação microbiológica?

Âmbito nacional: Legislação de cada país

Âmbito internacional: ICMSF e *Codex Alimentarius*

7

Introdução

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)

- Formada em 1962 por meio da ação do Comitê Internacional de Microbiologia de Alimentos e Higiene
- Fornece informação científica básica por meio de estudos extensos e faz recomendações com base nestas informações (= livros, documentos de discussão ou publicações referenciadas).
- Foi a primeira a estabelecer orientação sobre o uso de planos de amostragem e critérios microbiológicos para alimentos no comércio internacional.

8

Introdução

Codex Alimentarius

- Criado em 1963
- Programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS)
- Objetivo de estabelecer normas internacionais na área de alimentos, incluindo critérios, diretrizes e guias com o objetivo de **proteger a saúde dos consumidores** e garantir práticas leais de comércio entre os países.

9

Introdução

Qual a diferença entre:

Padrões, Diretrizes, Critérios e Especificações



10

Definições

Padrões microbiológicos: referem-se a níveis microbiológicos compulsórios estipulados em regulamentos (válido para fins de fiscalização);

Diretrizes microbiológicas: são níveis microbiológicos determinados para orientação (órgão reconhecido), os quais não tem força legal;

Critérios microbiológicos: nível com força legal ou não;

Especificações microbiológicas: são acordadas em ou entre companhias e geralmente não têm implicações legais diretas.

11

Critério microbiológico

12

Critério microbiológico

Critérios microbiológicos:

- definem a **aceitabilidade** de um produto, de um lote de alimento ou de um processo
- baseado na **ausência** ou na **presença** de micro-organismos, no seu **número**, e/ou na **quantidade** das suas toxinas/metabólitos, por unidade(s) de massa, volume, área ou lote.

Podem ser critérios microbiológicos de higiene ou segurança

13

Critério microbiológico

Segundo o *Codex Alimentarius*, para estabelecer um critério microbiológico é necessário:

- Seleção do micro-organismo de interesse e/ou suas toxinas (riscos à saúde pública);
- Plano de amostragem;
- Definição dos métodos analíticos para sua detecção e/ou quantificação;
- Estabelecimento dos limites microbiológicos considerados apropriados para o alimento no(s) ponto(s) específico(s) da cadeia de alimentos.

15

Seleção dos micro-organismos

O ICMSF classifica os micro-organismos em diferentes categorias:

Sem risco direto à saúde

Indicadores de qualidade do produto (não patogênicos)

Exemplos: contagem total (bactérias aeróbias mesófilas), enumeração de bolores e leveduras.

17

Critério microbiológico

Critérios Microbiológicos de Higiene:

- definem a aceitabilidade de um produto ou de um lote de alimento em função da presença ou quantidade de **micro-organismos indicadores** de higiene do processo produtivo.

Critérios Microbiológicos de Segurança:

- definem a aceitabilidade de um produto ou de um lote de alimento em função da presença ou quantidade de **micro-organismos patogênicos** e/ou suas toxinas/metabólitos.

14

Seleção dos micro-organismos

Para estabelecer os critérios de aprovação ou reprovação de um produto, é necessário conhecer quais micro-organismos devem ser pesquisados.

A pesquisa dos micro-organismos definidos vai determinar se o produto está ou não adequado para consumo (engloba aspectos higiênico sanitários e de saúde pública).

16

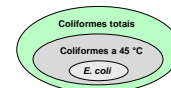
Seleção dos micro-organismos

Risco indireto à saúde

Indicam as condições higiênico sanitárias do produto.

Não são necessariamente patogênicos, mas podem indicar a presença de patógenos.

Exemplo: Coliformes termotolerantes.



Risco direto à saúde

Micro-organismos patogênicos de interesse em alimentos.

Exemplos: *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* etc.

18

Seleção dos micro-organismos

- Dependendo da gravidade da patologia que provocam
- Tamanho dos surtos que podem causar
- Os micro-organismos que causam risco direto à saúde são classificados em três grupos:

1. Risco direto, moderado e difusão limitada:

Causam enfermidades relativamente brandas.

Exemplos: *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* etc.

19

Seleção dos micro-organismos

2. Risco direto, moderado e difusão extensa:

Causam enfermidades mais graves que o grupo anterior;

Possuem doses infectantes mais baixas que o grupo anterior;

Exemplos: *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella* etc.

3. Risco direto e grave

São potencialmente patogênicos e podem levar à morte.

Exemplos: *Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* etc.

20

Planos de amostragem

21

Plano de amostragem

Determina o número de unidades de produto de cada lote a ser inspecionado e os critérios de aceitação.

Importante:

- Quanto maior o número de unidades analíticas, maior o significado estatístico (alimentos: 100% - impraticável)
- A distribuição dos micro-organismos no alimento não é homogênea;
- 1 a 10% dos lotes de produtos processados podem ser liberados com contaminação não detectável por amostragem analítica de produto final.

22

Plano de amostragem - definições

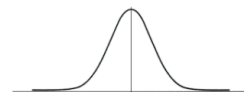
- ❖ **Unidade amostral:** embalagem individual a ser analisada, obtida de forma totalmente aleatória como parte da amostra geral.
- ❖ **Porção ou unidade analítica:** alíquota retirada da unidade amostral que será analisada.
- ❖ **Amostra indicativa:** composta por um número de unidades amostrais inferior ao estabelecido em plano amostral.
- ❖ **Amostra representativa:** amostra constituída por um determinado número de unidades amostrais estabelecido por plano de amostragem.

23

Tipos de plano de amostragem

Plano de amostragem por variáveis

Quando as contagens microbianas obedecem a uma distribuição normal-logarítmica.



Plano de amostragem por atributos

Quando não há conhecimento anterior da distribuição dos micro-organismos.

Necessário estabelecimento de parâmetros (n, c, m, M)

24

Definições de indicadores de plano por atributos

Lote = conjunto de produtos de um mesmo tipo, processados pelo mesmo fabricante, sob condições essencialmente iguais.

N = **número total** de unidades do lote

n = número de **unidades** retiradas **aleatoriamente** de um lote e analisadas **independentemente**

c = **número máximo aceitável de unidades** que podem ser aceitas com contagens **acima do limite m**, desde que **não ultrapasse M**.

25

Definições de indicadores de plano por atributos

m = limite máximo aceitável

É o valor que separa qualidade aceitável (satisfatória) da qualidade marginalmente aceitável (intermediária) do produto.

Valores abaixo do limite "m" são desejáveis.

M = limite superior (máximo) tolerável

É o valor máximo que algumas unidades amostrais (c) podem atingir.

Separa a qualidade marginalmente aceitável (intermediária) da inaceitável. Valores acima de "M" não são aceitos.

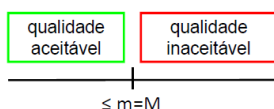
26

Planos de amostragem por atributos

Planos de duas classes:

Classificam os lotes em duas categorias: "Qualidade Aceitável" e "Qualidade Inaceitável". A decisão é baseada em dois atributos: atende ou não o limite "m".

Aplicável para limites qualitativos. Neste caso o c é zero



27

Planos de amostragem por atributos

Exemplo de plano de duas classes:

Análise de *Salmonella* spp. em hortaliças frescas, "in natura".

n= 5

c= 0

m= Aus/25 g

M= -

*Critério: ausência de *Salmonella* em 25 g de produto

Se 1 amostra for positiva: Rejeita-se o lote todo!

28

Planos de amostragem por atributos

Planos de três classes:

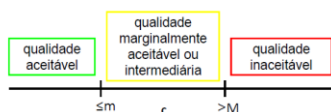
Classificam os lotes em três categorias:

"Qualidade Aceitável",

"Qualidade Intermediária"

"Qualidade Inaceitável".

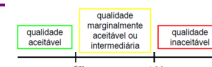
A decisão leva em consideração limite máximo aceitável (m), faixa de intermediária e limite inaceitável (>M).



29

Planos de amostragem por atributos

Exemplo de plano de três classes:



Análise de *Bacillus cereus* em batata cozida, refrigerada.

$$n= 5 / c = 2 / m = 5 \times 10^2 / M = 5 \times 10^3$$

Se 1 amostra der contagem acima de 5×10^3 ou mais de 2 amostras derem contagem entre 5×10^2 e 5×10^3 : **Rejeita-se o lote!**

Se nenhuma amostra apresentar contagem superior a 5×10^3 ou até duas amostras derem contagem entre 5×10^2 e 5×10^3 : **Aceita-se o lote !**

30

Planos de amostragem por atributos

Conceito “escolha de casos”

“Caso” é uma classificação dos planos de amostragem que variam de 1 (menos rigoroso) a 15 (mais rigoroso).

A escolha do caso e, dessa forma, do plano de amostragem, depende do risco microbiológico, incluindo:

- Gravidade relativa do perigo para a qualidade do alimento ou a saúde do consumidor, com base no micro-organismo envolvido;
- Expectativa de sua destruição, sobrevivência ou multiplicação durante o manuseio normal do alimento.

31

Critérios Microbiológicos Planos de amostragem (ICMSF)	Condição de uso / consumo do produto		
	Reduz o risco	Mantém o risco	Aumenta o risco
Baixo risco: Contaminantes em geral, reduzem a vida útil (ex: cont. total)	Caso 1 n=5 c=3 3 classes	Caso 2 n=5 c=2 3 classes	Caso 3 n=5 c=1 3 classes
Perigo indireto e baixo: Indicadores (ex: coliformes)	Caso 4 n=5 c=3 3 classes	Caso 5 n=5 c=2 3 classes	Caso 6 n=5 c=1 3 classes
Perigo moderado: Risco direto (ex: <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i>)	Caso 1 n=5 c=2 3 classes	Caso 8 n=5 c=1 3 classes	Caso 9 n=10 c=1 3 classes
Perigo sério: Grave, mas sem risco de vida e duração moderada (ex: <i>Salmonella</i> spp)	Caso 10 n=5 c=0 2 classes	Caso 11 n=10 c=0 2 classes	Caso 12 n=20 c=0 2 classes
Perigo severo: Risco de vida, sequelas crônicas, duração longa (ex: <i>S. Typhi</i> , <i>C. botulinum</i>)	Caso 13 n=15 c=0 2 classes	Caso 14 n=20 c=0 2 classes	Caso 15 n=60 c=0 2 classes

32

Exemplo de plano de amostragem

Os ovos são perecíveis por serem altamente nutritivos, permitindo a multiplicação microbiana.

Eles estão associados com certos patógenos de origem alimentar, em especial com a *Salmonella* spp.

Apesar dos processos de pasteurização, os ovos e produtos à base de ovos podem estar contaminados devido tratamentos térmicos insuficientes ou por contaminação pós-pasteurização.

Tabela – Planos de amostragem para produtos com ovos

Organismo-alvo	Caso	Classe do plano	n	c	Limite (g-1)	
					m	M
Contagem aeróbia em placas	2	3	5	2	5x10 ⁴	10 ⁶
Coliformes	5	3	5	2	10	10 ³
<i>Salmonella</i> spp.	10	2	5	0	0	-
(população em geral)	11	2	10	0	0	-
	12	2	20	0	0	-
<i>Salmonella</i> spp.	10	2	15	0	0	-
(população de alto risco)	11	2	30	0	0	-
	12	2	60	0	0	-

Adaptada de ICMSF (1986)

33

Metodologia analítica

Definição da metodologia analítica a ser adotada

Diferentes métodos analíticos podem ser utilizados para uma mesma determinação.

Devem ser validados por instituições de competência internacionalmente reconhecidas.

No Brasil, a RDC 331/2019 e IN 60/2019 determina a utilização de metodologias internacionalmente reconhecidas, obedecendo-se ao disposto no *Codex Alimentarius*.

35

Plano de amostragem

BRASIL

No Brasil, o plano de amostragem para análises microbiológicas de alimentos segue o determinado na **RDC 724/2022** e **IN 161/2022**.

Este plano segue o proposto pelo ICMSF.

I. FRUTAS E DERIVADOS						
Categorias Específicas	Micro-organismo/Toxina/Metabólito	n	c	m	M	
a) "In natura", inteiras, selecionadas ou não	<i>Salmonella</i> /25g	5	0	Aus	-	
	<i>Escherichia coli</i> /g	5	2	10 ²	10 ³	
b) Preparadas (inteiras, descascadas ou fracionadas), sanitizadas, refrigeradas ou congeladas	<i>Salmonella</i> /25g	10	0	Aus	-	
	<i>Escherichia coli</i> /g	5	2	10	10 ²	
c) Branqueadas ou cozidas	<i>Salmonella</i> /25g	10	0	Aus	-	
	<i>Enterobacteriaceae</i> /g	5	1	10 ²	10 ³	

34

Metodologia analítica

Metodologias mais utilizadas:

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods: American Public Health Association (APHA) e ICMSF.

Bacteriological Analytical Manual (BAM): Food and Drug Administration (FDA) e *Association of Official Analytical Chemists International (AOAC International)*.

Além das metodologias da *International Organization for Standardization (ISO)*.

36

Metodologia analítica

Caso sejam utilizados outros métodos laboratoriais, ou os métodos oficiais com modificações:

- Estes devem ser validados por estudos comparativos intra e inter laboratoriais que certifiquem os resultados obtidos;
- Os registros dos processos de validação devem estar disponíveis sempre que necessário.

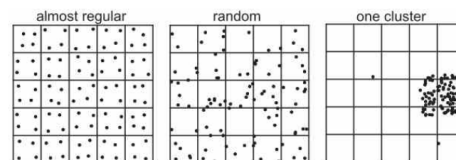
37

Metodologia analítica

Amostragem (seleção das amostras)

Uma amostra microbiológica não será homogênea em toda a matriz do alimento, assim o processo de seleção de uma alíquota envolve um elemento de aleatoriedade

Ha probabilidade de se encontrar números diferentes de micro-organismos em cada amostra ou sub-amostra.



FONTE: FAO/WHO, Risk Manager's Guide to the Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods (2014)

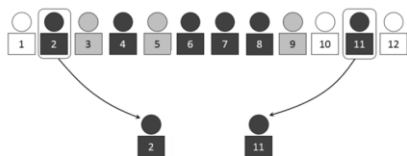
38

Metodologia analítica

Amostragem (seleção das amostras)

Aleatória simples

Dado um conjunto, enumeramos seus elementos e realizamos um sorteio.



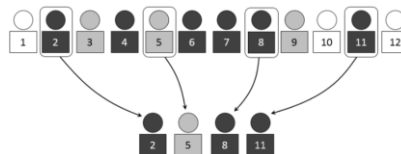
39

Metodologia analítica

Amostragem (seleção das amostras)

Sistemática

Dado um conjunto de elementos ordenados, retiramos periodicamente um elemento para a amostra; Intervalo pré-estabelecido.



40

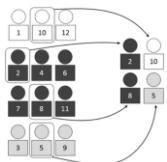
Metodologia analítica

Amostragem (seleção das amostras)

Estratificada

Quando uma população pode ser dividida em subgrupos (estratos) que são mais ou menos homogêneos.

Após a determinação dos estratos, seleciona-se uma amostra aleatória simples de cada estrato.



41

Interpretação dos resultados

Produto em condições sanitárias satisfatórias:

Resultados iguais ou abaixo dos limites estabelecidos;

No laudo: "Produto (ou lote) de acordo com os padrões legais vigentes".

Produto em condições sanitárias insatisfatórias:

Resultados acima dos limites estabelecidos;

No laudo: "Produto (ou lote) impróprio para o consumo humano por apresentar..."

42

Alimento envolvido em surtos!!!

Análise mais ampla do que consta na legislação;

Pesquisa de vírus, parasitas e outros possíveis patógenos não listados nos padrões microbiológicos vigentes.



43

Equívocos comuns

- Utilizando um esquema de amostragem "realista" (alto n), é possível certificar a ausência de um agente patogênico em um lote de alimentos.
- Os planos de amostragem atuais assumem que os micro-organismos estão distribuídos homogeneamente em um lote.
- Se a unidade amostral testada for negativa, o lote está livre do patógeno.
- Reamostragem para confirmar resultado positivo.

44

Referências

BRASIL. **Instrução Normativa nº. 161, de 01 de julho de 2022.** Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 2022.

BRASIL. **Resolução RDC nº. 724, de 01 de julho de 2022.** Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. **Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods (CAC/ GL-21).** Rome: FAO, 1997. FAO/WHO Food Standards Program.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 602p.

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Editora Atheneu, 2008. p.148-153. Capítulo 8.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos em alimentos 8: utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação de produto.** São Paulo: Blucher, 2015. 536 p.

45