

MANUAL DO ALUNO

DISCIPLINA TRANSFORMAÇÃO

Módulo 1

República Democrática de Timor-Leste
Ministério da Educação



FICHA TÉCNICA

TÍTULO

MANUAL DO ALUNO - DISCIPLINA DE TRANSFORMAÇÃO
Módulo 1

AUTOR

RITA COSTA

COLABORAÇÃO DAS EQUIPAS TÉCNICAS TIMORENSES DA DISCIPLINA

COLABORAÇÃO TÉCNICA NA REVISÃO

DESIGN E PAGINAÇÃO

UNDESIGN - JOAO PAULO VILHENA
EVOLUA.PT

IMPRESSÃO E ACABAMENTO

Centro de Impressão do Ministério da Educação, Juventude e Desporto

ISBN

978 - 989 - 753 - 037 - 1

TIRAGEM

50 EXEMPLARES

COORDENAÇÃO GERAL DO PROJETO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO DE TIMOR-LESTE
2013



Índice

Microbiologia dos Alimentos	7
Apresentação.....	9
Objetivos da aprendizagem	9
Âmbito dos conteúdos.....	9
INTRODUÇÃO	11
1. TAXONOMIA MICROBIANA	17
1.1. Bactérias	30
1.2. Bolores e Leveduras	39
Bolores.....	43
Leveduras	46
Vírus.....	48
Algas Unicelulares.....	50
Protozoários.....	50
Atividades – Exercícios.....	53
2. NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS	55
<i>Como se multiplicam os Microrganismos?</i>	55
2.1. Fatores Intrínsecos	57
2.2. Fatores Extrínsecos	62
Atividades – Exercícios.....	66
3. MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS.....	67
3.1. Ação dos microrganismos na conservação	67
3.2. Efeitos dos fungos (bolores e leveduras) na Indústria Agroalimentar	70
3.3. Efeitos das bactérias na Indústria Agroalimentar	86



Atividades – Exercícios.....	113
4. DOENÇAS ALIMENTARES.....	115
4.1. Microrganismos Patogénicos.....	122
4.2. Prevenção de doenças de origem alimentar	137
Atividades – Exercícios.....	140
5. PRÁTICAS LABORATORIAIS	142
5.1. Regras de trabalho em laboratório.....	142
5.2. Preparação de material	147
5.3. Preparação de meios de cultura	154
5.4. Análises sumárias de pesquisa de alguns microrganismos com importância para a indústria	156
Atividades – Exercícios.....	169
ATIVIDADES - PRÁTICAS	170
Atividade Prática n.º 1 - Estudo das características da imagem em microscopia ótica	170
Atividade Prática n.º 2 - Observação de células do epitélio lingual	172
Atividade Prática n.º 3 - Observação de células vegetais.....	174
Atividade Prática n.º 4 - Observação microscópica de protozoários.....	176
Atividade Prática n.º 5 - Observação microscópica de bolores.....	178
Atividade Prática n.º 6 - Observação microscópica de leveduras	180
Atividade Prática n.º 7 - Observação microscópica das bactérias do iogurte	183
Atividade Prática n.º 8 - Observação microscópica de bactérias - Coloração de Gram.....	186
Atividade Prática n.º 9 - Observação microscópica de halobactérias	191



CULTIVO DE MICRORGANISMOS EM LABORATÓRIO - Documento de Apoio às aulas práticas	194
GLOSSÁRIO DE MICRORGANISMOS	201
BIBLIOGRAFIA	234







Microbiologia dos Alimentos

Módulo 1



Apresentação

A importância dos microrganismos na conservação e transformação dos produtos agroalimentares justifica a introdução deste módulo como suporte a todo o processo tecnológico.

Objetivos da aprendizagem

- Aplicar as regras básicas de segurança num laboratório de Microbiologia;
- Reconhecer a importância da Microbiologia;
- Reconhecer a ação dos microrganismos patogénicos nos alimentos;
- Identificar os fatores que influenciam o crescimento dos microrganismos;
- Reconhecer a importância da manipulação desses fatores na conservação dos alimentos.

Âmbito dos conteúdos

1. Taxionomia microbiana
 - 1.1. Bactérias
 - 1.2. Bolores e leveduras
2. Nutrição e crescimento de microrganismos
 - 2.1. Fatores intrínsecos
 - 2.2. Fatores extrínsecos
3. Microbiologia dos alimentos
 - 3.1. Ação dos microrganismos na conservação
 - 3.2. Efeitos dos fungos (bolores e leveduras) na indústria agroalimentar
 - 3.3. Efeito das bactérias na indústria agroalimentar
4. Doenças alimentares
 - 4.1. Microrganismos patogénicos
 - 4.2. Prevenção de doenças de origem alimentar
5. Práticas laboratoriais
 - 5.1. Regras de trabalho em laboratório



5.2. Preparação de material

5.3. Preparação de meios de cultura

5.4. Análises sumárias de pesquisa de alguns microrganismos com importância para a indústria agroalimentar.



INTRODUÇÃO

No início da humanidade e durante milhares de anos, a alimentação baseava-se nos abundantes recursos da natureza. Depois o homem passou a plantar, a criar animais e a produzir os seus alimentos.

Com o aparecimento dos alimentos preparados surgem as doenças transmitidas devido à deterioração (conservação inadequada). Na Idade Média, a morte de milhares de pessoas por Ergotismo era frequente, devia-se à intoxicação aguda por ingestão de cereais contaminados pelo fungo *Claviceps purpurea*.

No século XIII, surgem os primeiros registos escritos sobre a importância da limpeza e higiene na produção de alimentos. Mais propriamente as primeiras normas de higiene que caracterizavam produtos cárneos quanto a boa ou má qualidade.

Relativamente à presença e atividade dos microrganismos em alimentos, é praticamente impossível precisar o início da sua compreensão, por parte do homem. É inegável que isso aconteceu antes do estabelecimento da microbiologia.

O homem intuitivamente desenvolveu técnicas para conservação, sem saber porquê, e nem qual o papel dos alimentos na transmissão de doenças.

Em 1658 Kircher (fig. 1) relatou a presença de “vermes” em carnes decompostas; usando um microscópio rudimentar, examinou doentes com peste bubónica e relacionou esta com putrefação.



Figura 1 - Kircher.

Antony van Leeuwenhoek (fig. 2) foi o primeiro microbiólogo de que há conhecimento. Negociava tecidos e fabricava chapéus. Dele diz-se ter inventado o microscópio, embora haja quem atribua a paternidade da invenção a Hans e Zacharias Janssen, também holandês, em 1590.

Leeuwenhoek foi seguramente o primeiro a fazer observações microscópicas de materiais biológicos.





Figura 2 - Antony van Leeuwenhoek.

Numa carta datada de 9 de outubro de 1676, a duas semanas de fazer 44 anos, escrevia à Royal Society of London, sociedade que incentivava pensadores de toda a Europa a contribuírem com ideias ou descobertas científicas a serem publicadas. O teor da carta era estranho para a época:

“No ano de 1675, em meados de setembro... descobri criaturas vivas na água da chuva que ficara estagnada por alguns dias num novo barril... Isso encorajou-me a investigar essa água mais atentamente, já que esses [animais] me pareciam aos olhos mais de dez mil vezes menores do que o [animal]... de nome pulga-d’água, que se pode ver em movimento na água à vista desarmada”.

Antony van Leeuwenhoek

Este comerciante têxtil holandês, Leeuwenhoek, divertia-se nas horas vagas, a montar lentes, tendo observado aquilo que denominou de “animalculus”, umas pequenas criaturas vivas apenas identificáveis através de vidros curvos que montou num microscópio rudimentar (fig. 3).



Figura 3 - Microscópio rudimentar de Leeuwenhoek.

Viu microrganismos que se moviam em gotas de chuva, infusões pútridas, saliva e vinagre. E narra, numa outra carta, o «horror» estampado na cara de pessoas que o visitaram para testemunhar as suas descobertas:



“Vieram várias damas a minha casa ansiosas para ver as pequenas enguias no vinagre, mas algumas ficavam tão enojadas com o espetáculo que juravam nunca mais usar vinagre. E se alguém contasse a essas pessoas, no futuro, que há mais dessas criaturas nos resíduos dos dentes da boca de um homem do que o total de homens de todo um reino? Especialmente naqueles que nunca limpam os dentes”.
Antony van Leeuwenhoek

As observações de Leeuwenhoek, homem de pouca formação científica, suscitaram, nessa época, grande interesse junto da comunidade científica e da sociedade, em geral, ainda que provocassem arrepios a algumas damas.

Foi ele quem deu os primeiros passos no universo microscópico que permitiram a muitos outros investigadores prosseguirem os seus estudos.



Figura 4 - Spallazani.

Em 1765 Spallanzani (fig. 4) mostra que com recipientes vedados de um modo mais eficiente e realizando a fervura por um tempo prolongado, a vida não surge espontaneamente. Demonstrou que uma infusão de carne aquecida durante 1 hora e em recipiente fechado permanecia longo tempo sem deteriorar.

Nicholas Appert, em 1809 desenvolveu uma técnica de conservação de alimentos, através do acondicionamento dos alimentos em garrafas de vidro com algum líquido, após as garrafas (fig. 5) serem rolhadas e lacradas com cera, eram fervidas em banho-maria por um determinado período, deste modo Appert conseguia um prolongamento do tempo de vida de prateleira destes alimentos. Utilizou este processo em vegetais e produtos cárneos.



Figura 5 - Garrafa de Appert.





Figura 6 - Nicholas Appert.

Na época, Appert (fig. 6) acreditava que a preservação do alimento devia-se à ausência de ar no interior da garrafa. Esta hipótese foi derrubada por Pasteur algumas décadas depois, em 1864, ao provar que os pequenos seres vivos que já haviam sido identificados por Leeuwenhoek em 1675 eram responsáveis por deteriorações nos alimentos e doenças no homem.

O termo *Bacterium* foi introduzido somente em 1828, pelo microbiologista alemão Christian Gottfried Ehrenberg. O género *Bacterium* compreendia bactérias com formato de bastão não formadoras de esporos. O género foi considerado um *nomen genericum rejiciendum* em 1954 pela Comissão Internacional de Nomenclatura Bacteriana.

Em 1837, Louis Pasteur (fig. 7) provou que a acidificação do leite era provocada por microrganismos, as suas experiências deram fundamento para a teoria microbiológica da doença. Foi mais conhecido do público em geral por inventar um método para impedir que leite e vinho causem doenças, um processo que veio a ser chamado *pasteurização*. Ele é considerado um dos três principais fundadores da microbiologia, juntamente com Ferdinand Cohn e Robert Koch.



Figura 7 - Louis Pasteur.

Pasteur, por solicitação de vinicultores e cervejeiros da região, começou a investigar a razão pela qual azedavam os vinhos e a cerveja. De novo, utilizando o microscópio, conseguiu identificar a bactéria responsável pelo processo. Propôs eliminar o problema aquecendo a bebida lentamente até alcançar 48° C, matando, deste modo, as bactérias, e encerrando o líquido posteriormente em cubas hermeticamente seladas para evitar uma nova contaminação. Este processo originou a atual técnica de pasteurização dos alimentos. Demonstrou, desta forma, que todo o processo de fermentação e decomposição orgânica ocorre devido à ação de organismos vivos.



A experiência de Pasteur (fig. 8), na qual utilizou balões com pescoço de cisne veio provar a presença de microrganismos no ar. Pasteur colocou um caldo nutritivo num balão de vidro, de pescoço curvo (pescoço de cisne). Ferveu o caldo existente no balão, o suficiente para matar todos os possíveis microrganismos que poderiam existir nele. Terminado o aquecimento, vapores da água proveniente do caldo condensaram-se no pescoço do balão e depositaram-se, sob forma líquida, na sua curvatura inferior. Como os frascos ficavam abertos, não se podia falar da impossibilidade da entrada do “princípio ativo” do ar. Com a curvatura do pescoço do balão, os microrganismos do ar ficavam retidos na superfície interna húmida e não alcançavam o caldo nutritivo. Quando Pasteur quebrou o pescoço do balão, permitindo o contacto do caldo existente dentro dele com o ar, constatou que o caldo ficou contaminado com microrganismos provenientes do ar.

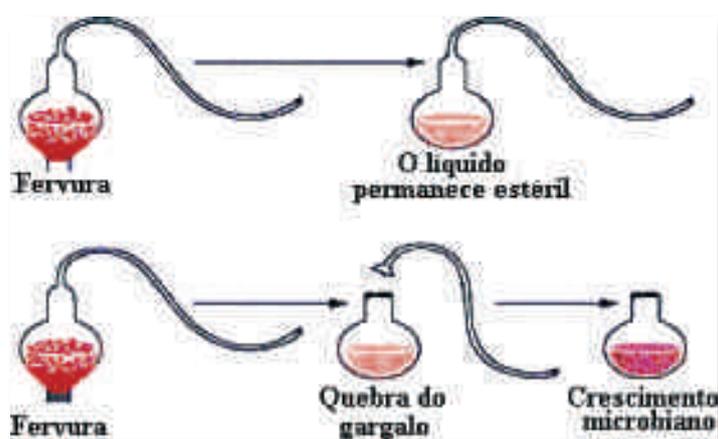


Figura 8 - Experiência de Pasteur.

As pesquisas de Pasteur demonstraram que o efeito da temperatura na preservação dos alimentos era na realidade sobre os microrganismos, observando que uma temperatura de 62 a 63°C por um período de uma hora e meia era suficiente para eliminar os microrganismos presentes em sumos de frutas. Este processo, que recebeu o nome de pasteurização, provocou um grande desenvolvimento na qualidade dos vinhos franceses, principal indústria francesa na época, concedendo a Pasteur um grande prestígio junto do governo do seu país.

Tanto as descobertas de Appert como de Pasteur foram desenvolvidas e amplamente aplicadas na indústria alimentar, até aos dias de hoje.



As guerras mundiais no século passado proporcionaram o desenvolvimento e aperfeiçoamento destas técnicas de conservação, visto existir a necessidade de abastecer as tropas com alimentos preparados seguros.

As alterações dos hábitos alimentares como consequência das guerras e da deslocação das pessoas dos meios rurais para os meios citadinos e industriais, levou à produção de alimentos que tivessem um período de conservação mais alargado do que os alimentos frescos e disponíveis localmente, uma vez que surgiu a necessidade de transportar os alimentos a grandes distâncias.

O início da era espacial exigiu a produção de alimentos seguros para os astronautas, uma vez que no espaço estes estariam durante períodos de tempo alargados sem outros fornecimentos de alimentos ou recursos médicos, no caso de doenças causadas por alimentos contaminados.

Hoje em dia, a microbiologia é uma ciência com imensas aplicações em campos vastíssimos, que vão da indústria à medicina, passando pela agricultura, engenharia, biotecnologia, geologia e ecologia.



1. TAXONOMIA MICROBIANA

Microbiologia

No mundo que vivemos tudo nos parece visível, no entanto existe um mundo invisível povoado de seres não visíveis a olho nu, que coabitam conosco e que são presença diária na nossa vida. Habitam na nossa pele, cabelos e dentro de nós nas mucosas do tubo digestivo.

A Microbiologia é definida como a ciência que estuda os organismos “demasiado pequenos” para serem observados a olho nu, ou seja, os microrganismos e as suas atividades. Não é possível observar seres vivos com dimensões inferiores a 1 mm de forma clara, pelo que devem ser examinados microscopicamente. Assim, a microbiologia tem como objeto de estudo as bactérias e arqueões, os vírus, os fungos, as algas unicelulares e os protozoários. Alguns membros destes grupos, em particular algumas algas e alguns fungos, têm dimensões suficientes para serem vistos sem o auxílio do microscópio.

A microbiologia preocupa-se com a forma, a estrutura, a reprodução, a fisiologia, o metabolismo e a identificação destes seres microscópicos. Inclui o estudo da sua distribuição natural, suas relações recíprocas e com outros seres vivos, seus efeitos benéficos e prejudiciais sobre os humanos e as alterações físicas e químicas que provocam no seu meio ambiente.

Na generalidade, a microbiologia estuda os organismos microscópicos unicelulares. Nas formas superiores de vida, os organismos são compostos por muitas células, que constituem tecidos altamente especializados e órgãos destinados a exercer funções específicas.

Nos indivíduos unicelulares, todos os processos vitais são realizados numa única célula e nos indivíduos pluricelulares as células têm funções especializadas organizadas em órgãos e tecidos. Independentemente da complexidade de um organismo, a **célula**

(fig. 9) é, na realidade, a **unidade básica da vida.**



Figura 9 - Células animal e vegetal



Um dos princípios fundamentais da biologia é que todos os seres vivos são formados por células. Assim na Biosfera encontramos dois tipos de seres vivos: os unicelulares, constituídos apenas por uma célula capaz de realizar todas as funções vitais, e os pluricelulares, constituídos por várias células, organizadas em tecidos diferenciados e especializados em diversas funções. As células podem ainda ser divididas em dois grandes grupos, consoante possuem ou não uma estrutura designada por núcleo, temos assim as células procarióticas e eucarióticas.

Atualmente os procariotas representam as formas de vida mais ancestrais que se conhecem. Este grupo agrega as **bactérias**, que incluem importantes espécies patogénicas, e os **arqueões** (arqueobactérias), que vivem nos ambientes mais extremos da Terra.

As células procarióticas (fig. 10) não possuem núcleo, sendo por isso as mais simples, exemplos delas são as bactérias e as cianobactérias, As células procariotas são as que formam as bactérias e as arqueas, que são uns seres bizarros capazes de sobreviver em ambientes inóspitos, como em salinas (halófilas), ou em geiseres (termófilas).

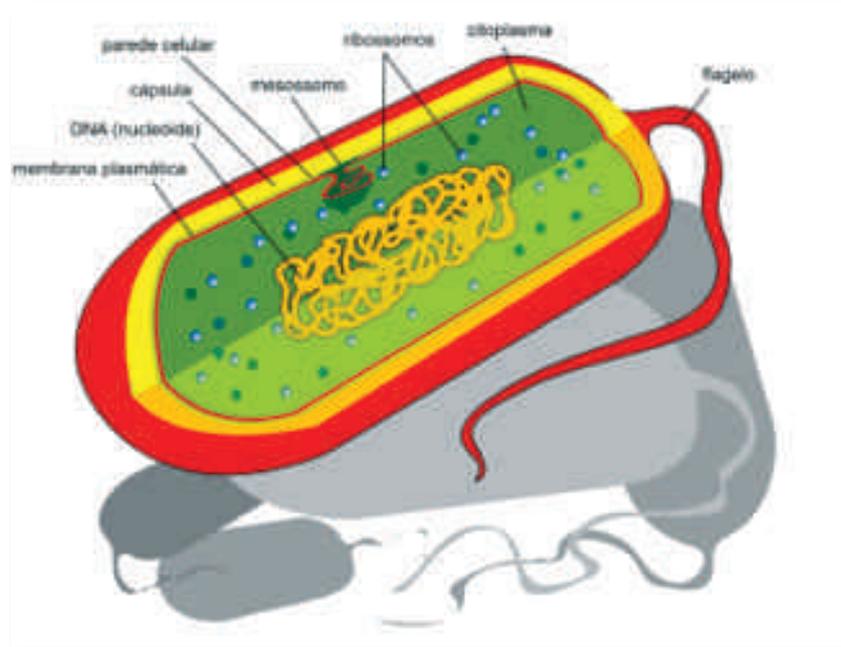


Figura 10 - Célula Procariótica

As células eucarióticas apresentam núcleo, tendo por isso uma estrutura mais complexa, estão representadas nos restantes grupos de seres vivos, são fundamentalmente semelhantes entre si e profundamente diferentes das células procarióticas.



Apesar de existirem algumas diferenças estruturais entre as células eucarióticas animais (fig. 11) e as células eucarióticas vegetais (fig. 12), ambas possuem três constituintes fundamentais: a membrana celular, o citoplasma e o núcleo.



Figura 11 - Célula animal

Quanto às suas semelhanças, registamos que a **membrana plasmática** constituída por duas camadas lipídicas fluídas e contínuas onde estão inseridas moléculas proteicas, esta membrana dá individualidade a cada célula e organiza as moléculas devido à sua permeabilidade que é a principal responsável pelo controlo da entrada e saída de substâncias da célula.

O **citoplasma** é um espaço intracelular preenchido por uma substância fluída, denominada por hialoplasma, onde está “mergulhado” tudo que se encontra dentro da célula, como moléculas e organelos, responsáveis pelo metabolismo da célula. É composto principalmente por água, cerca de 80%, mas também contém iões, sais, macromoléculas, como proteínas e o RNA. Na zona central da célula existe uma estrutura com material genético que nas células procariotas se designa por nucleóide e nas células eucariotas se designa por **núcleo**.



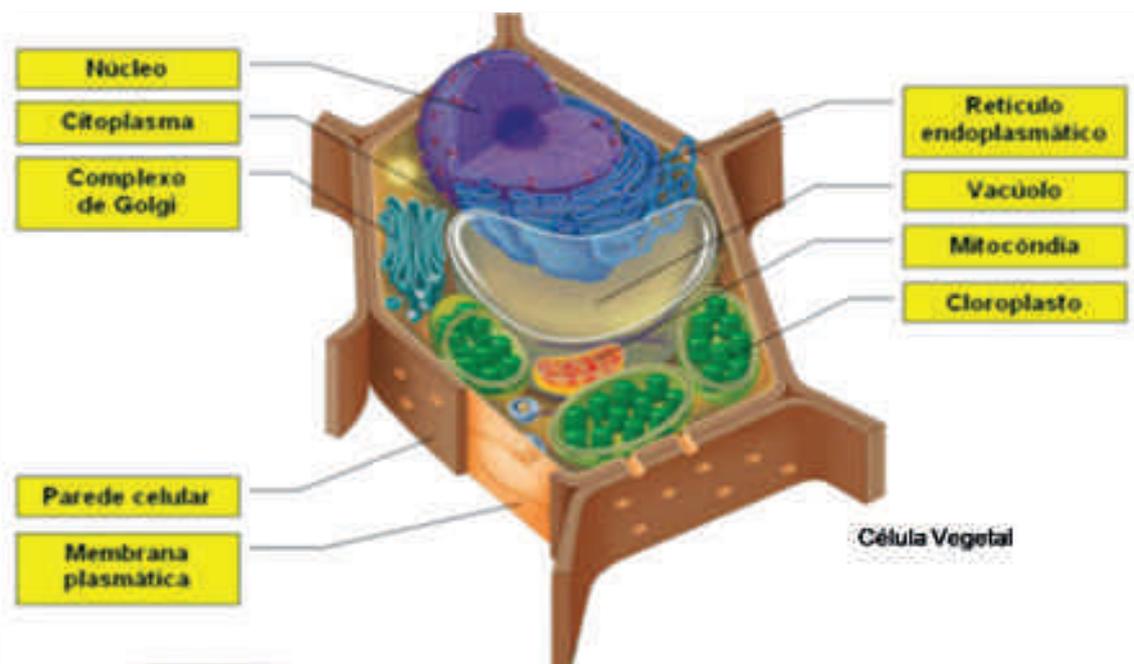


Figura 12 - Célula vegetal

Relativamente às diferenças entre a célula eucariótica animal e vegetal, consideramos que, as células vegetais têm algumas diferenças importantes, em relação às células animais, mas as maiores diferenças são a existência de cloroplastos, parede celular e vacúolos. Caracterizamos assim as estruturas:

Cloroplastos - organelos similares às mitocôndrias, no sentido em que se podem autorreproduzir e são como que as fábricas de energia das células, capturam a energia luminosa emitida pelo sol e convertem-na em ATP e açúcares.

Parede celular - as células vegetais não são flácidas como as dos animais e possuem uma parede celular rígida que as envolve, a parede celular, esta é formada por fibras de celulose embebidas numa substância constituída por vários tipos de polímeros. As moléculas de celulose são lineares e providenciam uma forma perfeita com vista à formação de pontes de hidrogénio, proporcionando desta forma, um meio de formação de longas e fortes fibras. É esta estrutura que é primeiramente responsável por assegurar que a célula não entra em rutura quando se encontra num meio hipertónico.



Vacúolos - Muitas vezes as plantas possuem, no centro das suas células, grandes estruturas membranares que contêm água, estas estruturas são denominadas por vacúolos e funcionam como reservatórios de água e de alimento, como lugar de acumulação de desperdícios celulares e funcionam ainda como suporte estrutural da célula com vista à manutenção da turgescência. Assim, quando a planta perde ou acumula água, os vacúolos perdem-na ou acumulam-na correspondentemente.

O que são microrganismos?

Ao longo da sua vida, muitas pessoas não se apercebem da existência dos microrganismos, a não ser que estes lhes causem alguma doença. No entanto, os microrganismos desempenham papéis muito importantes nas nossas vidas: as atividades benéficas são muito superiores às atividades indesejáveis. Dos milhares de bactérias que se conhecem, muito poucas causam doenças. De resto, a vida na Terra não seria possível sem a atividade microbiana. As bactérias absorvem o azoto do ar e ajudam algumas plantas a crescer; as bactérias e os fungos degradam plantas e animais mortos, alguns poluentes químicos e restos de alimentos; alguns alimentos, medicamentos e produtos utilizados na indústria são produzidos pelos microrganismos.

Estes seres vivos, de tão pequenas dimensões, são o grupo de organismos que existe em maior quantidade na Terra e estão presentes, quer em ambientes terrestres quer em ambientes aquáticos. Foi estimado que a massa total de células microbianas na Terra é aproximadamente 25 vezes o total da massa animal. Se conseguíssemos observá-los a olho nu, quando nos observássemos ao espelho, em simultâneo, observaríamos cerca de 100 triliões de microrganismos: na pele, no cabelo, na boca, ao longo do intestino, nas mãos... Cada grama de fezes excretada contém cerca de 10 biliões de microrganismos! No que concerne à presença de microrganismos (fig. 13), os alimentos não são exceção. Todos os alimentos (exceto os esterilizados), são portadores de microrganismos. Alguns desempenham atividades benéficas, participando na produção de alimentos como o queijo, o iogurte, os enchidos e a cerveja. Outros são indesejáveis porque estragam os alimentos (por exemplo, o pão ou a fruta com bolor) ou são patogénicos (causam doenças).





Figura 13 - Imagens ampliadas por microscópio de vários microrganismos.

Taxonomia Microbiana

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade de tamanho, de forma, de complexidade, de habitat, etc., pelo que surgiu a necessidade de agrupá-los de acordo com as suas características. Assim surgiu a taxonomia, ciência que distribui os organismos por categorias taxonómicas ou taxa que traduzem o seu grau de semelhança.

A taxonomia é importante porque permite organizar grandes quantidades de informação, permite fazer uma previsão das características de um determinado microrganismo isolado, a criação de grupos com nomes precisos o que facilita a comunicação científica e é essencial para a identificação correta dos microrganismos.

A taxonomia divide-se em:

- **classificação** - define a forma de distribuição dos organismos em grupos taxonómicos (*taxa*; singular *taxon*) (com base em semelhança mútua ou relação evolutiva).
- **nomenclatura** - atribui nomes aos grupos taxonómicos de acordo com regras pré-estabelecidas.
- **identificação** - é o processo que permite determinar a que grupo taxonómico pertence um determinado organismo isolado.



As características utilizadas em Taxonomia, na classificação e identificação de microrganismos são características **fenotípicas** associadas à morfologia, fisiologia e metabolismo, e à análise genética. E características **ecológicas**, associadas ao ciclo de vida, às relações simbióticas, à capacidade de causar doenças em hospedeiros, habitat preferencial e aos fatores que afetam o crescimento.

A taxonomia microbiana considera as seguintes designações:

ESTIRPE - população de organismos que se distingue de outros dentro de uma espécie; descende de um único organismo ou cultura pura (microrganismos isolados). Estirpes de uma espécie podem variar ligeiramente de várias formas quando apresentam diferenças bioquímicas e fisiológicas (biovar); diferem morfologicamente (morfovar) e diferenciam-se nas propriedades antigénicas (serovar).

ESTIRPE TIPO - é a primeira estirpe a ser estudada de uma espécie. Geralmente é a melhor caracterizada. Não é necessariamente o membro mais representativo da espécie.

ESPÉCIE - é a unidade básica da taxonomia microbiana e refere-se ao conjunto de estirpes que partilham muitas características estáveis e diferem significativamente de outros grupos de estirpes (definição que pode ser subjetiva); ou conjunto de estirpes com composição G+C (genoma) idêntica, e em que a sequência de nucleotídeos do DNA apresenta 70% de semelhança.

GÉNERO - refere-se a um grupo bem definido de uma ou mais espécies, claramente separado de outros géneros.

FILOGENIA ou CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA - É a área da taxonomia que estuda as relações evolutivas entre os organismos vivos (é a base da classificação moderna).

A hierarquia taxonómica revela relações evolutivas ou filogenéticas entre espécies. A **evolução** traduz as alterações numa linhagem de descendência ao longo do tempo conduzindo a novas variedades e espécies. Traduz a história evolutiva de um grupo de organismos.



A designação, **FILOGENIA** tem origem do grego: *phylon* - tribo, raça; *genesis* - origem.

Árvores filogenéticas

As relações evolutivas são mostradas em árvores filogenéticas (fig. 14). Para analisar as árvores filogenéticas é necessário identificar:

Ramos - o comprimento representa a distância evolutiva ou o grau de relacionamento evolutivo entre os organismos.

Nó - unidade taxonómica (e.g., espécie ou um gene).

Nós internos - representam organismos ancestrais.

Nó externo - representam organismos conhecidos, atuais.

Árvore com raiz tem um nó que corresponde ao ancestral comum.

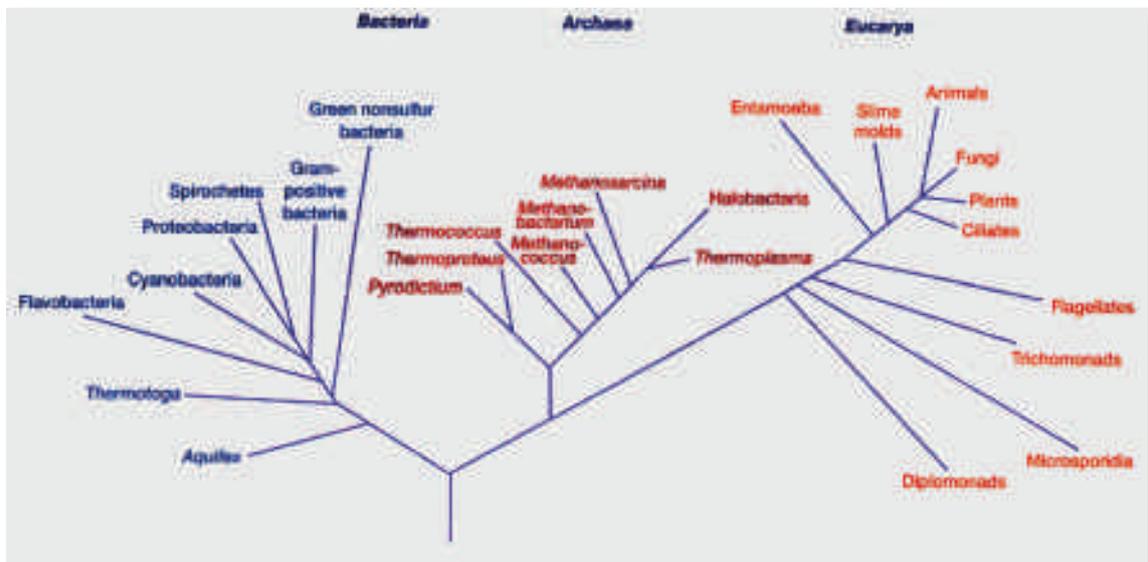


Figura 14 - Árvore Filogenética (adaptado de Prescott, Harley, Klein, "Microbiology", 5th ed.)

Na presente árvore filogenética, os microrganismos estão distribuídos pelos três domínios (fig. 15):

Eukarya - Eucariotas

- Microrganismos: protozoários, microalgas (fig. 16), fungos.
- Organismos superiores: animais, plantas, algas multicelulares.



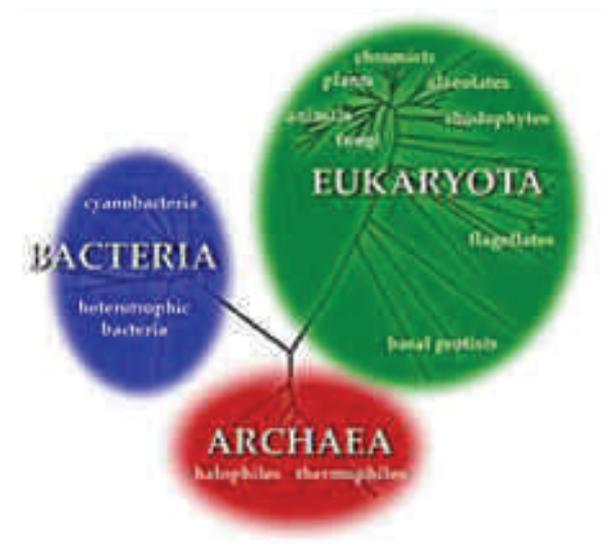


Figura 15 - Eucariota, Archaea e Bacteria.

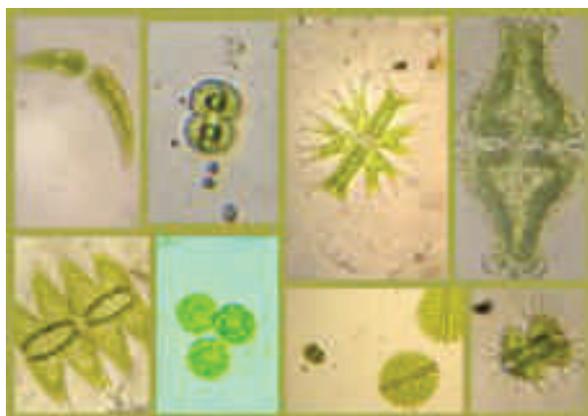


Figura 16 - Microalgas.

Archaea - Procariotas

Domínio *Archaea* (fig. 17 e 18) divide-se em: **2 “phyla”** (filos), **8 classes** e **12 ordens**.

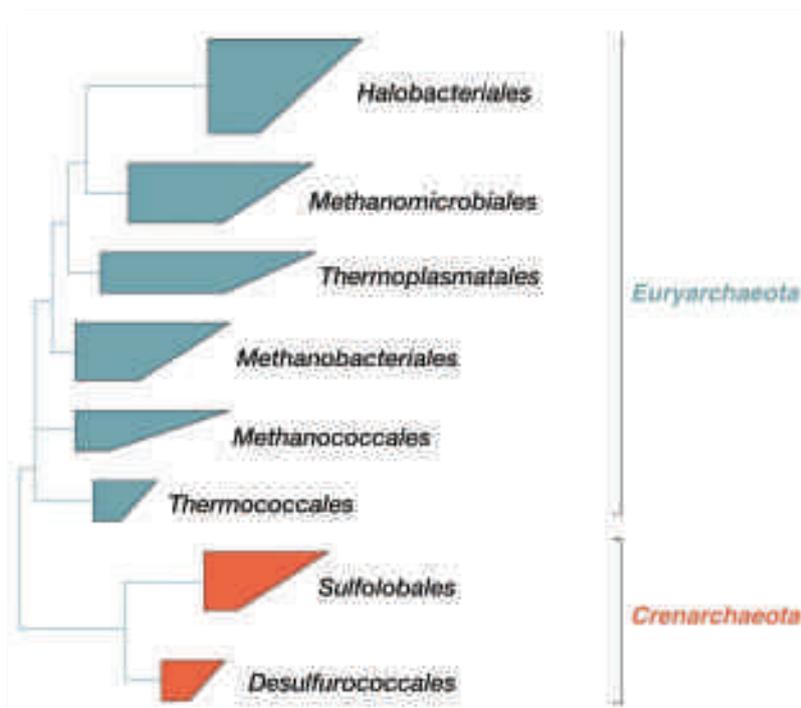


Figura 17 - Domínio Archaea.



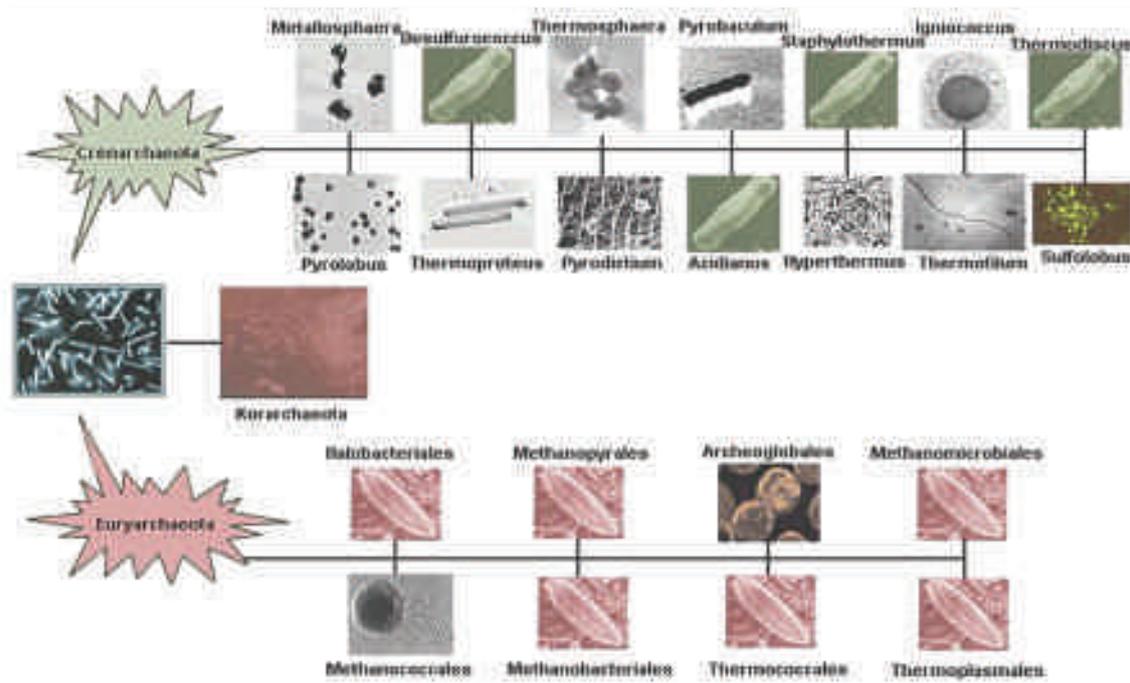


Figura 18 - Microrganismos do domínio Archaea.

- A maior parte são bactérias **extremófilas**, isto é, vivem em ambientes extremos, por exemplo:

- Bactérias (fig. 19) que necessitam de níveis elevados de sal (halobactérias) - vivem em lagos salgados, salinas, etc.;



Figura 19 - Lago salgado no Quênia - Proliferação de halobactérias vermelhas.



- Bactérias que necessitam de temperaturas elevadas (fig. 20) - vivem em fontes termais em regiões com atividade vulcânica, etc.

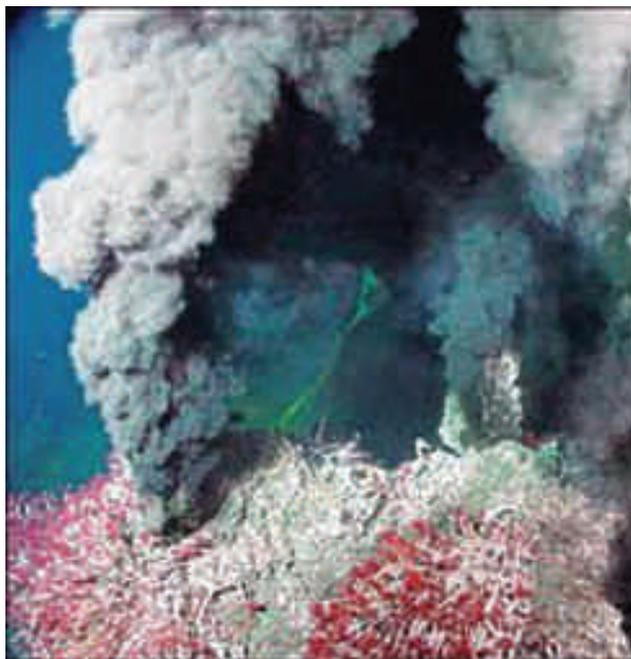


Figura 20 - Regiões vulcânicas (Temperaturas altas e/ou pH ácido) (Aberturas hidrotermais fundos marinhos, por exemplo Açores, Yellowstone park, EUA, Islândia).

- Bactérias produtoras de gás metano (metanogénicas; vivem em habitats anóxicos como rúmen/animais, sedimentos de lagos, campos de arroz (fig. 21), etc.)



Figura 21 - Campo de arroz.



Bactéria - Procariotas

Engloba todas as outras bactérias, incluindo maior parte das bactérias ambientais (por exemplo: do solo, da água, da microflora natural de animais e plantas), bactérias patogénicas para o ser humano, animais e plantas, bactérias fotossintéticas, etc.

Domínio *Bacteria* (fig. 22) - *divididos em 23 “phyla”* (filos), metabólica e morfologicamente diversos.

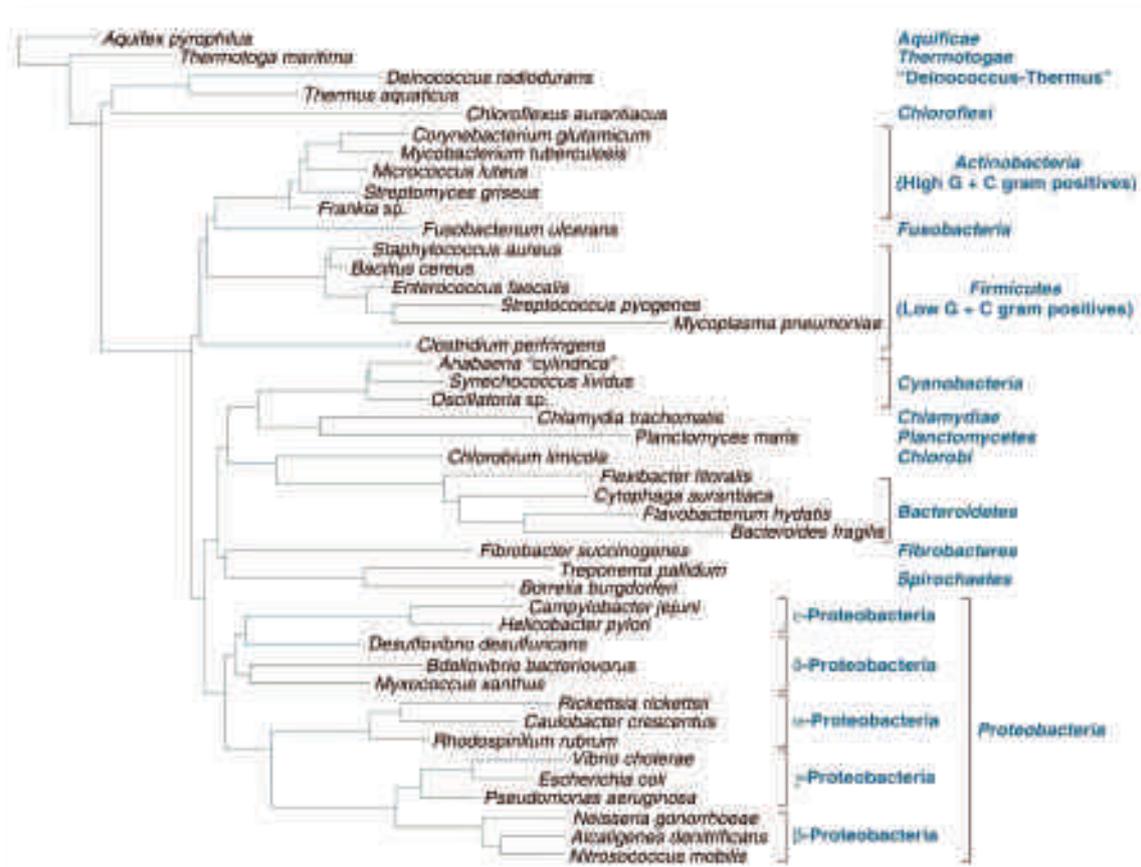


Figura 22 - Domínio Bacteria

Classificação de Procariotas

O manual *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* contém descrições de todas as espécies bacterianas identificadas. Neste manual pode-se encontrar todas as bactérias conhecidas e identificadas. O manual está em constante atualização.

- 1ª Edição (1º volume em 1984) - utilizava classificação fenética
- 2ª Edição (desde 2001) - usa classificação filogenética



A classificação das bactérias mudou radicalmente nos últimos anos, de forma a refletir o conhecimento atual sobre filogenia, como resultado dos recentes avanços na sequência dos genes, na bioinformática e na biologia computacional.

A descoberta da estrutura celular procariótica, distinta de todos os outros organismos (os eucariontes), levou os procariontes a serem classificados como um grupo separado ao longo do desenvolvimento dos esquemas de classificação de seres vivos.

As bactérias foram inicialmente classificadas entre as plantas por Lineu e agrupadas com os fungos (na classe Schizomycetes) com exceção das cianobactérias que eram consideradas “algas azuis”; em 1866, Ernst Haeckel incluiu-as no reino Protista; em 1969, foram incluídas entre os procariotas no reino Monera por Whittaker. Em 1977, com o advento das técnicas moleculares, Carl Woese dividiu os procariotas em dois grupos, com base nas sequências “16S” do rRNA, que chamou de Eubacteria e Archaeobacteria,¹ mais tarde, renomeados por ele próprio para Bactéria e Archaea. Woese argumentou que estes dois grupos, em conjunto com os eucariotas, formam domínios separados com origem e evolução separadas a partir de um organismo primordial. Desta forma, as bactérias poderiam ser divididas em vários reinos, mas normalmente são tratadas como um único reino, dividido em filos ou divisões. São geralmente consideradas um grupo monofilético, mas esta noção tem sido contestada por alguns autores. Alguns cientistas, no entanto, consideram que as diferenças genéticas entre aqueles dois grupos procariotas não justificam a divisão e que tanto as arqueobactérias como os eucariontes provavelmente originaram-se a partir de bactérias primitivas.

Vulgarmente, utiliza-se o termo “bactéria” para designar também as archaeas, que atualmente constituem um domínio separado. As cianobactérias (as “algas azuis”) são consideradas dentro do domínio **Bacteria**.

Além da sequência do RNA ribossomal, arqueias e bactérias diferem, entre outras características, na constituição química da parede celular. As arqueias não apresentam, em sua parede celular, o peptidoglicano, constituinte típico das bactérias.

A classificação proposta por Thomas Cavalier-Smith em 2003 reconhece os dois domínios:

- *Prokaryota*, compreendendo os reinos *Archaea* e *Bacteria*;
- *Eukaryota*, que inclui todos os demais organismos, tanto unicelulares quanto pluricelulares).



1.1. Bactérias

As bactérias classificam-se morfológicamente de acordo com a forma da célula e com o grau de agregação:

Quanto à forma

- **Coco** : De forma esférica ou subesférica.
- **Bacilo** : Em forma de bastonete (do género *Bacillus*)
- **Vibrião** : Em forma de vírgula (do género *Vibrio*)
- **Espirilo** : de forma espiral/ondulada (do género *Spirillum*)
- **Espiroqueta** : Em forma acentuada de espiral.

As bactérias podem apresentar diversas formas conforme se agrupam a seguir:

Bactérias em forma de cocos		
Cocos isolados 	Cocos em cadeia 	Cocos aglomerados 
Bactérias em forma de bastonete		
Bacilos 	Bacilos em cadeia 	
Bactérias com forma curva e em espiral		
Espirilos 	Vibriões 	



Quanto ao grau de agregação

Apenas os bacilos e os cocos formam colónias (fig. 23).

- **Diplobacilos** : Bacilos reunidos dois a dois.
- **Estreptobacilos** : Bacilos alinhados em cadeia.
- **Diplococo** : De forma esférica ou subesférica e agrupadas aos pares.
- **Tétrades** : Cocos associados em grupos de 4 cocos.
- **Estreptococos** : Formam cadeia semelhante a um “colar”.
- **Estafilococos** : Uma forma desorganizada de agrupamento, formando cachos.
- **Sarcina** : De forma cúbica, formado por mais de 4 ou 8 cocos simetricamente postos.



Figura 23 - Diferentes tipos de associações de cocos: 1 - Cocos isolados, 2 - Diplococos, 3 - Tétrades, 4 - Sarcina, 5 - Estreptococos e 6 - Estafilococos.

As bactérias são seres unicelulares com dimensões médias de 1 a 5 μm ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$).

Estrutura Celular

A célula bacteriana, por ser procariótica, não possui organelos membranares nem DNA organizado em verdadeiros cromossomas, como os das células eucariotas.

Assim as estruturas da célula procariota (fig. 24) são:

1. Os **pili** são microfibrilas proteicas que se estendem da parede celular em muitas espécies Gram-negativas. Têm funções de ancoramento da bactéria ao seu meio e são importantes na patogénese. Um tipo especial de pilus é o pilus sexual, estrutura oca que serve para ligar duas bactérias, de modo a trocarem plasmídeos.



2. Os **plasmídeos** são pequenas moléculas de DNA circular que coexistem com o nucleóide. São comumente trocados na conjugação bacteriana. Os plasmídeos têm genes, incluindo frequentemente aqueles que protegem a célula contra os antibióticos.
3. Há cerca de 20 mil **ribossomas** num citoplasma bacteriano. Os ribossomas procariotas são diferentes dos eucariotas e essas diferenças foram utilizadas para desenvolver antibióticos que só afetam os ribossomas bacterianos.
4. O **citoplasma** é preenchido pelo **hialoplasma**, um líquido com consistência de gel, semelhante ao dos eucariotas, com sais, glicose e outros açúcares, RNA, proteínas funcionais e várias outras moléculas orgânicas.
5. A **membrana celular** é uma dupla camada de fosfolípidos, com proteínas imersas.
6. A **parede celular** bacteriana é uma estrutura rígida que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às bactérias. É uma estrutura complexa composta por peptidoglicanos - polímeros de hidratos de carbono ligados a proteínas. É alvo de muitos antibióticos, incluindo a penicilina e seus derivados, que inibem as enzimas transpeptidase e carboxipeptidase, responsáveis pela síntese dos peptidoglicanos. Contém em espécies infecciosas de bactérias, a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS).
7. Algumas espécies de bactérias têm uma camada de polissacarídeos que as protege contra a desidratação, fagocitose e ataque de bacteriófagos, chamada de **cápsula**.
8. O **nucleóide** consiste numa única grande molécula de DNA com proteínas associadas, sem delimitação por membrana - portanto, não é um verdadeiro núcleo. O seu tamanho varia de espécie para espécie.
9. O **flagelo** é uma estrutura proteica que roda como uma hélice. Muitas espécies de bactérias movem-se com o auxílio de flagelos. Os flagelos bacterianos são completamente diferentes dos flagelos dos eucariotas.

Além dessas estruturas há também:

- **Vacúolos bacterianos:** não são verdadeiros vacúolos, já que não são delimitados por dupla membrana lipídica como os das plantas. São antes grânulos de substâncias de reserva, como açúcares complexos.



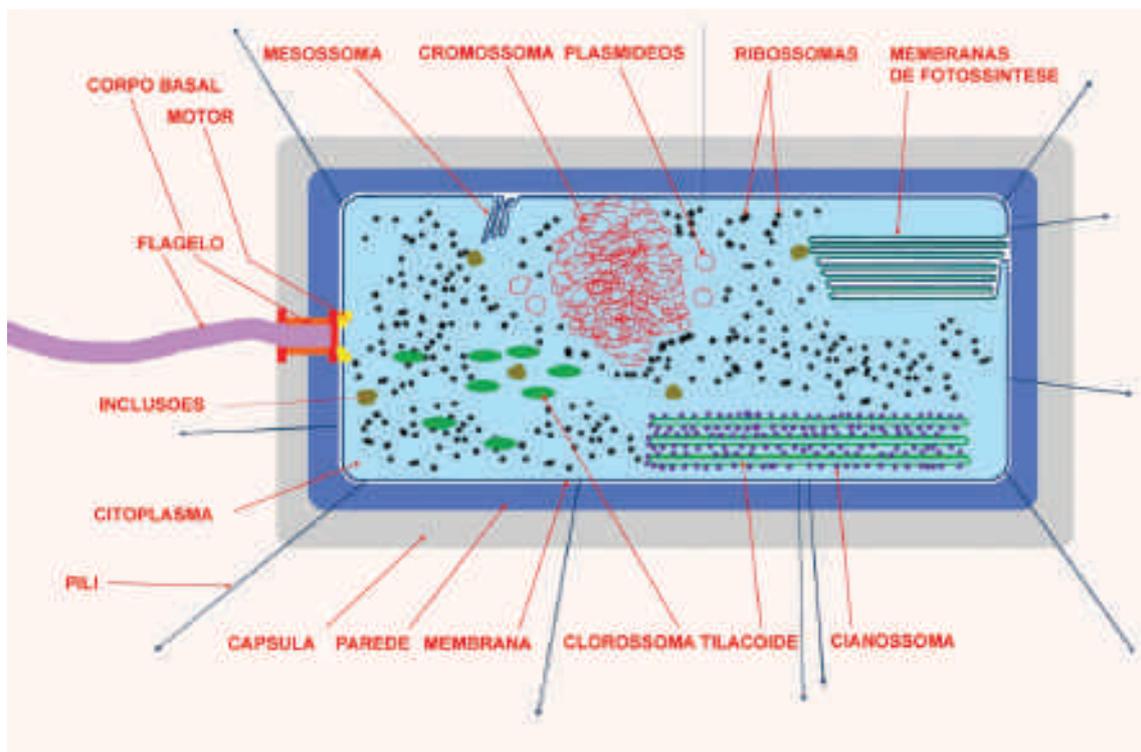


Figura 24 - Esquema de bactéria hipotética que reúne todas as principais estruturas.

- Algumas bactérias podem formar **esporos**, com um invólucro de polissacáridos mais espesso e ficar deste modo num estado de vida latente enquanto as condições ambientais forem desfavoráveis.

Movimento das bactérias

As bactérias móveis deslocam-se, quer através da utilização de flagelos, quer deslizando sobre superfícies, ou ainda por alterações da sua flutuabilidade. As espiroquetas constituem um grupo único de bactérias que possuem estruturas semelhantes a flagelos designadas por filamentos axiais ligadas a dois pontos da membrana celular no espaço periplasmático, além de terem uma forma helicoidal que gira no meio para se movimentar.

Os flagelos bacterianos (fig. 25) encontram-se organizados de diferentes formas: algumas bactérias possuem um único flagelo polar (numa extremidade da célula), enquanto outras possuem grupos de flagelos, quer numa extremidade, quer em toda a superfície da parede celular (bactérias “peritricosas”).



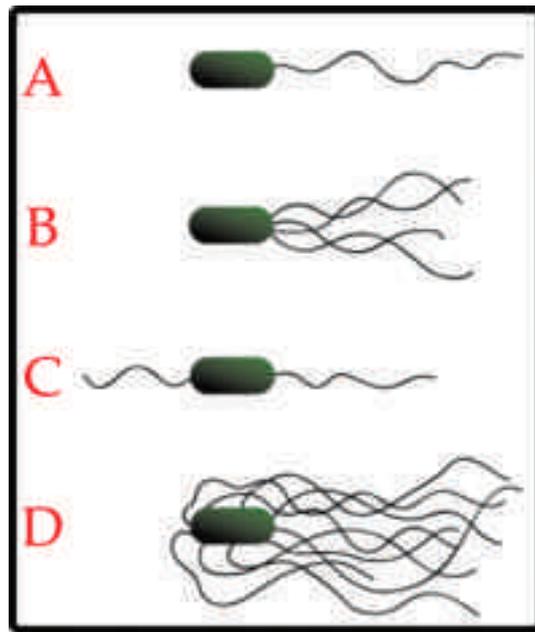


Figura 25 - Tipos de flagelos: A - único flagelo polar; B - vários flagelos num pólo; C - dois flagelos, um em cada pólo; D - vários flagelos dispersos na parede celular.

Reprodução

As bactérias têm uma estrutura muito mais simples do que os eucariontes (A) (fig. 26). O seu processo de reprodução é, assim, menos complexo. O filamento de DNA começa por fixar-se numa invaginação da membrana plasmática e duplica-se (B). O novo filamento encontra-se preso noutra ponta a pouca distância do primeiro. A membrana plasmática distende-se, acompanhando o alongamento da célula e separando os filamentos de DNA (C). Quando a célula duplica o seu tamanho e os filamentos se separam, a membrana dobra-se para dentro e isola as duas células (D). Finalmente, forma-se uma nova parede celular e os dois indivíduos separam-se (E).

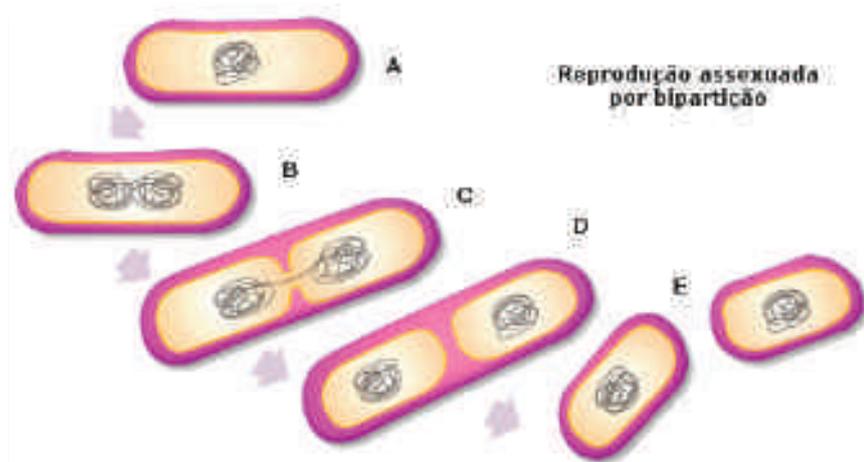


Figura 26 - Reprodução de bactérias.



Metabolismo segundo fontes de energia e carbono

Fonte de carbono

De acordo com a fonte de átomos de carbono para a produção de moléculas orgânicas, as bactérias são classificadas em dois grandes grupos:

- **Autotróficas:** As bactérias autotróficas obtêm moléculas de carbono apenas a partir do dióxido de carbono.
- **Heterotróficas:** São bactérias que obtêm os átomos de carbono a partir de moléculas orgânicas que captam do ambiente. Além do dióxido de carbono as bactérias necessitam de hidratos de carbono.

Fonte de energia

As bactérias podem utilizar como fonte de energia a luz, substâncias inorgânicas ou orgânicas:

- **Luz:** Como as bactérias que fazem fotossíntese ou **foto-tróficas**.
- **Compostos químicos:** Como as bactérias **químio-tróficas**.
 - Composto inorgânico: lito-tróficas
 - Composto orgânico: organo-tróficas

Classificação segundo o metabolismo

Quando combinadas as classificações de fonte de energia e de fonte de átomos de carbono expostas acima, pode-se classificar as bactérias em quatro grandes grupos, quanto às suas necessidades nutricionais:

Foto-autotróficas

Bactérias foto-autotróficas são capazes de produzir elas mesmas as substâncias orgânicas que lhes servem de alimento, tendo como fonte de carbono o gás carbônico e como fonte de energia a luz.

- **Cianobactérias:** são fotolito-autotróficas e aparentemente foram as pioneiras no uso da água como fonte de elétrons. Incluiriam as proclorófitas (gêneros *Prochloron*, *Prochlorothrix* e *Prochlorococcus*), apesar de distinguirem-se destas por apresentar apenas clorofila, além de ficobilinas azul e vermelha.



Estes pigmentos são responsáveis pelas diversas colorações, muitas vezes brilhantes, que estas bactérias apresentam.

- **Sulfobactérias:** realizam um tipo de fotossíntese em que a substância dadora de hidrogénio não é a água, mas compostos de enxofre, principalmente o gás sulfídrico (H_2S). Por isso essas bactérias produzem enxofre elementar (**S**) como subproduto da fotossíntese, e não oxigénio gasoso, como na fotossíntese que utiliza H_2O .

Foto-heterotróficas

As bactérias foto-heterotróficas utilizam a luz como fonte de energia, mas não convertem exclusivamente o dióxido de carbono em moléculas orgânicas. Assim, as bactérias utilizam compostos orgânicos que absorvem do meio externo, como alcoóis, ácidos gordos, glicídios etc., como fonte de carbono na produção dos componentes orgânicos da sua célula. Estas células são bactérias anaeróbias e, como exemplo, pode-se citar as bactérias não-sulfurosas verdes como *Chloroflexus spp.*, e as não-sulfurosas púrpuras, como *Rhodopseudomonas spp.*

Químio-autotróficas

As bactérias químio-autotróficas utilizam oxidações de compostos inorgânicos como fonte de energia para a síntese de substâncias orgânicas a partir de dióxido de carbono (CO_2) e de átomo de hidrogénio (H) provenientes de substâncias diversas. As substâncias orgânicas produzidas são utilizadas como matéria-prima para a formação dos componentes celulares ou degradadas para libertar energia para o metabolismo.

Químio-heterotróficas

A maioria das espécies bacterianas apresenta nutrição químio-heterotrófica, ou seja, tanto a fonte de energia quanto a de átomos são moléculas orgânicas que a bactéria ingere como alimento. De acordo com a fonte das substâncias que lhe servem de alimento, as bactérias heterotróficas são classificadas em saprofágicas e parasitas. Exemplo: *Clostridium*.

- **Sapofágicas:** alimentam-se a partir de matéria orgânica sem vida, como cadáveres ou porções desprezadas por outros seres vivos.



- **Parasitas:** alimentam-se a partir de tecidos corporais de seres vivos e podem ser patogénicas.

Classificação Gram

A classificação Gram é muito usada para identificar bactérias. É feita com base numa técnica de coloração desenvolvida pelo microbiologista dinamarquês Hans Christian Gram. A técnica de Gram permite dividir as bactérias em dois grupos, devido às características distintas da membrana e parede:

- **Gram-positivas:** Classificação baseada na propriedade destas bactérias não serem descoradas pelo álcool porque a sua membrana é composta por várias camadas de peptidoglicanos ao redor da célula. Estas bactérias possuem parede celular com uma única e espessa camada de peptidoglicanos. A coloração de Gram, tingem com a cor púrpura ou azul quando fixadas as bactérias com **crystal violeta** (fig. 27 e 29), porque retêm este corante mesmo sendo expostas ao álcool.

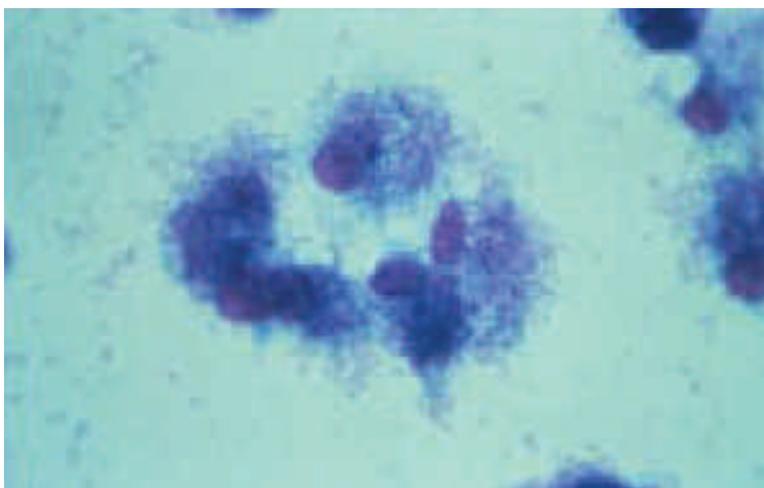


Figura 27 - Bactérias Gram + (coloração azuis ou violetas).

- **Gram-negativas:** Classificação baseada na propriedade destas bactérias serem descoradas pelo álcool, porque tem a membrana composta por peptidoglicanos, rica em lipídeos e proteínas hidrofóbicas. As bactérias Gram negativas (-) possuem uma parede celular mais delgada e uma segunda membrana lipídica - distinta quimicamente da membrana plasmática, no exterior desta parede celular. No processo de coloração o lípido desta membrana mais externa é



dissolvido pelo álcool e liberta o primeiro corante, o cristal violeta. Ao final da coloração, estas células são visualizadas com a tonalidade rosa-avermelhada do segundo corante, **safranina**, que lhes confere apenas a coloração vermelha (fig. 28 e 29).

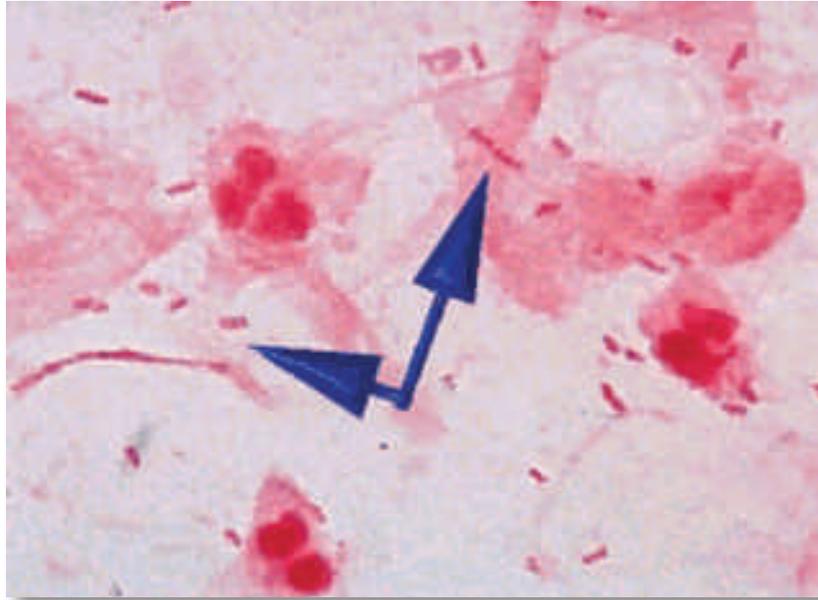


Figura 28 - Bactérias Gram - (coloração vermelha).

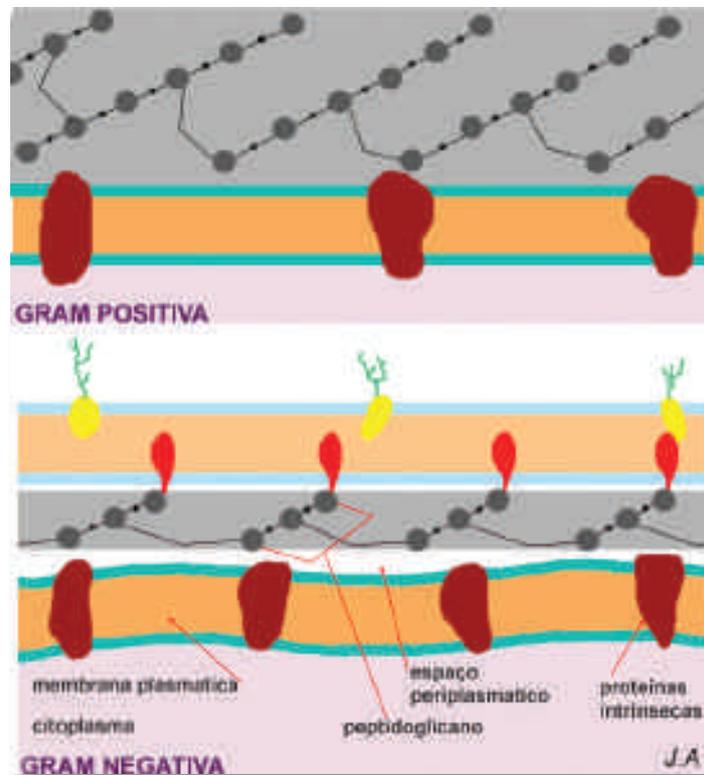


Figura 29 - Gram Positiva (+) - Parede e membrana. Gram negativa (-) - Membrana externa, parede e membrana.



1.2. Bolores e Leveduras

Os bolores e leveduras ou fungos constituem um grupo de organismos muito diversificado. No dia-a-dia convivemos com numerosos fungos (fig. 30) ou com os seus produtos e nem damos conta. Contudo, os vinhos, os queijos, os cogumelos, a podridão dos frutos ou a doença vulgarmente chamada “pé-de-atleta” têm os fungos como fator comum. Os fungos estão presentes em quase todos os nichos ecológicos, são um grupo muito numeroso. Estão descritas cerca de 69000 espécies de fungos embora seja estimada a existência de 1500000 espécies diferentes em todo o mundo.



Figura 30 - Diversidade de fungos: a-e) cogumelos; f) leveduras; g-h) bolores.



Independentemente da sua forma e do seu tamanho, os fungos são seres eucariotas. Existem fungos unicelulares como as leveduras, mas a maioria é multicelular.

Os fungos podem viver nas mais variadas temperaturas, entre 60°C a -10°C. Como são heterotróficos, alimentam-se de matéria orgânica (viva ou morta). Desenvolvem-se bem em locais húmidos e de sombra. De acordo com o modo como obtêm alimento, podem ser classificados em três grandes grupos:

1 - FUNGOS DECOMPOSITORES

Os fungos decompositores são conhecidos como fungos saprófitas e alimentam-se de matéria orgânica morta ou resíduos dos mesmos, tais como pele, folhas e frutas. Esta ação decompositora (fig. 31) é de extrema importância para o equilíbrio biológico nos diversos ecossistemas terrestres, colaborando com a reciclagem de matéria na natureza.



Figura 31 - Fungos decompositores - fungos a decompor morangos.

2 - FUNGOS PARASITAS

Os fungos parasitas (fig. 32) são aqueles fungos que vivem dependentes de outros seres vivos, causando prejuízo e podem até matá-los. Muitas doenças nos vegetais são causadas por fungos deste tipo.

Nos seres humanos estes fungos podem causar as chamadas micoses, como por exemplo “o pé de atleta”.



Figura 32 - Fungos parasitas - fungo a parasitar as folhas de uma planta.



3 - FUNGOS MUTUALISTAS

Os fungos mutualistas são fungos que se associam a outros seres e ambos os organismos são beneficiados. Os líquens (fig. 33) são exemplos deste tipo de associação, onde o fungo se une a uma alga. As algas portadoras de clorofila são capazes de realizar a fotossíntese e compartilham a matéria produzida com o fungo, que por sua vez retém água e protege a alga da desidratação.



Figura 33 - Fungos mutualistas - líquens.

OS FUNGOS E O SER HUMANO

Vamos considerar alguns dos principais grupos de fungos, de interesse para o ser humano:

Ficomicetos

Podem ser aquáticos ou terrestres, unicelulares ou pluricelulares. Um exemplo deste tipo são os do género *Rhizopus* (fig. 34), conhecidos como bolor preto do pão. A grande maioria dos ficomicetos vive como decompositores, contribuindo para a reciclagem da matéria na natureza.



Figura 34 - *Rhizopus*.

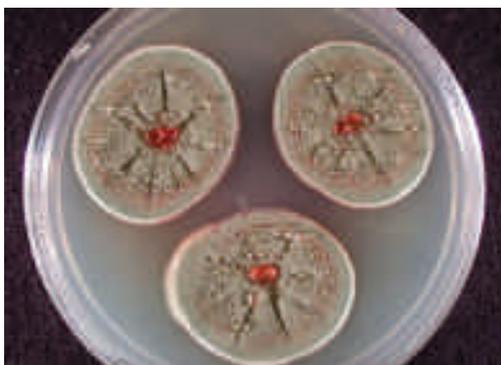


Figura 35 - *Ascomicetos*.

Ascomicetos

Determinadas espécies de ascomicetes (fig. 35) são utilizados na fabricação de queijos como no caso do género *Penicilium*. Este género também é utilizado na produção de penicilina, um tipo de antibiótico, como o visto na foto ao lado:



Basidiomicetos

Também conhecidos como cogumelos de chapéu, abrange várias espécies de fungos, alguns comestíveis, como o champignon.

Alguns são venenosos, como este *Amanita muscaria* (fig. 36), capaz de provocar alucinações a quem o ingere.



Figura 36 - *Amanita muscaria*.

Alimentação

Os fungos não possuem clorofila, como as plantas, por isso não podem realizar fotossíntese, e conseqüentemente, não produzem o seu próprio alimento. Eles soltam ao seu redor uma substância chamada exo-enzima, que é praticamente igual a uma enzima digestiva. Estas enzimas digerem moléculas orgânicas do ambiente, e então o fungo absorve o alimento que foi digerido pelas exo-enzimas.

Existem dois nichos ecológicos para os fungos: decompositores e parasitas. A diferença entre os dois é que os parasitas se fixam em organismos vivos, enquanto os decompositores se fixam em organismos mortos. Os parasitas ainda podem ser insetívoros ou helmintívoros, respetivamente comedores de insetos ou minhocas. O primeiro liberta uma substância pegajosa à sua volta, onde moscas e pequenos insetos ficam presos e são digeridos pelas exo-enzimas. O segundo, o fungo liberta substâncias tranquilizantes que imobilizam as minhocas (fig. 37).

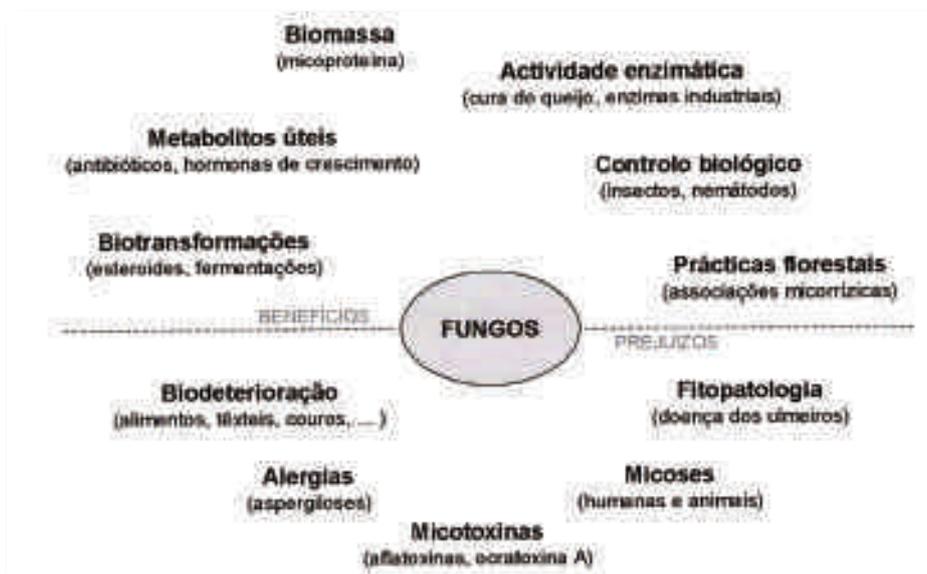


Figura 37 - As atividades dos fungos segundo benefícios e prejuízos.



Bolores

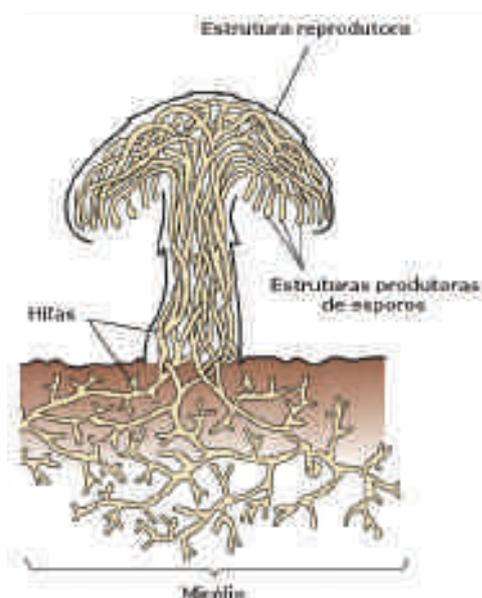
Os bolores são seres pluricelulares, que se tornam visíveis a olho nu, quando se multiplicam sobre os alimentos (por exemplo, o bolor do pão). Alguns deles são especialmente perigosos para a saúde, devido à produção de toxinas.

Os cogumelos são um exemplo de bolores macroscópicos.

Os cogumelos (fig. 38) apresentam um elevado teor proteico. No entanto, muitas espécies são venenosas.



Figura 38 - Diferentes tipos de cogumelos.



Estrutura

Os bolores ou fungos filamentosos são compostos por **hifas** (fig. 39), as quais constituem filamentos de células formando uma rede, chamada de **micélio**. Estas invadem o alimento de modo a realizar a absorção de seus nutrientes.

Figura 39 - Estruturas dos bolores.

A divisão das hifas (fig. 40) em células pode ser incompleta, logo são chamadas de hifas **septadas** e as barreiras divisórias chamadas **septos**. **Se a divisão das hifas está** ausente, neste caso são chamadas **asseptadas** ou **cenocíticas**. Os bolores geralmente possuem paredes celulares feitas com quitina e outros materiais. As hifas podem ser modificadas para produzir estruturas celulares altamente especializadas. Por exemplo, existem bolores que ao parasitarem plantas perfuram as células destas através de haustórios e assim digerem as substâncias no seu interior; alguns bolores vivem no interior do solo capturando vermes e outros pequenos animais.



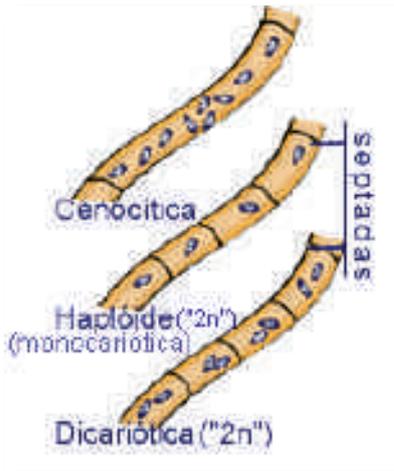
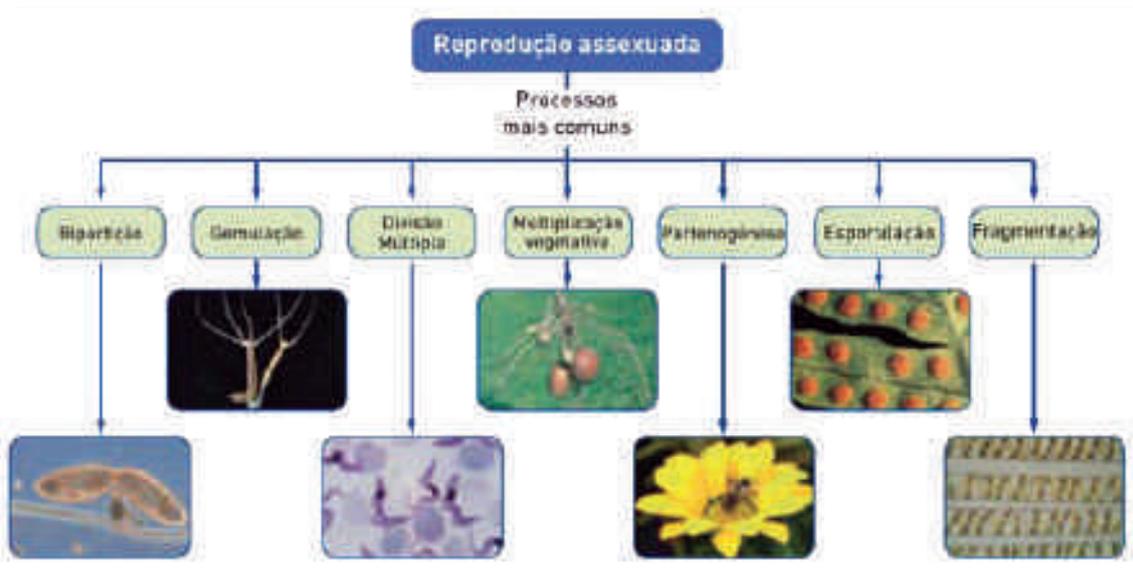


Figura 40 - Tipos de hifas - Pelos poros das hifas septadas ocorre trânsito de citoplasma e de núcleos de uma célula para outra. Nos fungos, os núcleos são haploides.

Reprodução

Os fungos terrestres podem-se reproduzir sexuada e assexuadamente. Existem vários processos de reprodução assexuada. Os mais comuns são: bipartição, divisão múltipla, fragmentação, gemulação, partenogênese, multiplicação vegetativa e esporulação.

a. Reprodução Assexuada por:



- **Fragmentação**

A maneira mais simples de um fungo filamentososo se reproduzir assexuadamente é por **fragmentação**: um micélio fragmenta-se originando novos micélios.

- **Esporulação**

Nos fungos terrestres, os corpos de frutificação produzem, por mitose, células abundantes, leves, que são espalhadas pelo meio, os esporos. Para a produção desse



tipo de esporo a ponta de uma hifa destaca-se do substrato e produz, através da mitose, centenas de células chamadas conidiósporos (fig. 41) (do grego, kónis = poeira), que permanecem unidas até serem libertadas. É o que acontece com o fungo *penicillium*, que assim foi chamado devido ao facto de a estrutura produtora de esporos - o conídio - se assemelhar a um pincel. Cada uma destas células, quando lançada no ambiente, poderá gerar um novo bolor, dependendo do local onde cair (como um pão, ou frutas).



Figura 41 - Conidiósporo de *Penicillium*.

Reprodução Sexuada

Um ótimo exemplo de fungo que se reproduz sexuadamente é o cogumelo, muito utilizado na culinária de alguns países. Ele é um cogumelo (corpo de frutificação) que produz esporângios (fig. 42) com formato de raquete de tênis, que se chamam basídios. Dentro de cada basídio ocorre uma meiose, originando quatro células, chamadas de basidiósporos. Eles são libertados no ambiente através do brotamento, a partir do basídio. Estes esporos geram hifas haploides. A junção de hifas haploides origina um micélio diploide, dentro do qual ocorrem novas meioses para a produção de mais esporos meióticos. A alternância de meiose e fusão de hifas (que se comportam como gametas) caracteriza o processo de reprodução sexuada. Este irá crescer e tornar-se num cogumelo, completando o ciclo.

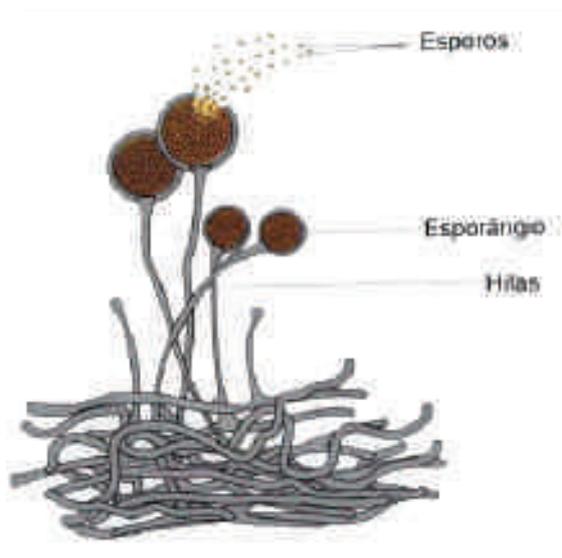


Figura 42 - Reprodução Sexuada.



Leveduras

As leveduras (fig. 43), tal como os bolores, são fungos, mas diferenciam-se por se apresentarem predominantemente, sob a forma unicelular. Como células simples, as leveduras crescem e reproduzem-se mais rapidamente do que os bolores e também são mais eficientes nas alterações químicas que provocam nos alimentos.

As leveduras são microrganismos utilizados no fabrico de muitos alimentos como, por exemplo, o pão, a cerveja, a cidra e o vinho.

Apesar dos seus benefícios na alimentação, as leveduras também podem ter uma intervenção nefasta, atuando como agentes de degradação dos alimentos. As alterações que provocam não causam normalmente doenças, no entanto, são extremamente importantes porque impossibilitam a comercialização dos alimentos.



Figura 43 - Levedura da cerveja - *Saccharomyces cerevisiae*.

Caraterísticas das Leveduras

- Unicelulares
- Não realizam fotossíntese
- São não-filamentosos
- A maioria tem formato oval
- São bastante distribuídas na natureza
- São encontradas como um pó branco que cobrem folhas e frutas
- Existem cerca de 350 espécies diferentes
- Podem ser parasitas, simbiontes, sendo, em sua grande parte, sapróbios
- Apresenta membrana celular bem definida
- Podem parasitar seres humanos, provocando doenças como a candidíase
- Membrana celular bem definida, existe a membrana citoplasmática e a maioria não possui cápsula.



Reprodução

- **Assexuada**

A **gemulação** ou **gemiparidade** ou **brotamento** é um processo de reprodução assexuada no qual ocorre a formação de uma dilatação denominada gema (ou gomo) formada por mitoses na superfície externa do organismo progenitor, podendo separar-se e dar origem a um novo indivíduo.

Neste tipo de reprodução, na superfície da célula adulta (célula mãe) desenvolve-se uma pequena saliência (célula-filha), uma gema ou broto (fig. 44) desenvolve-se e transformar-se-á numa nova célula e após um tempo desprende-se, passando a ter uma vida independente.

Alguns géneros e espécies de leveduras dividem-se por cissiparidade semelhante às bactérias. Encontramos algumas leveduras que foram blastóporos, pequenos esporos formados na extremidade de um esterigma, ou ainda artrósporos, formado pela fissão de uma célula em vários pontos.

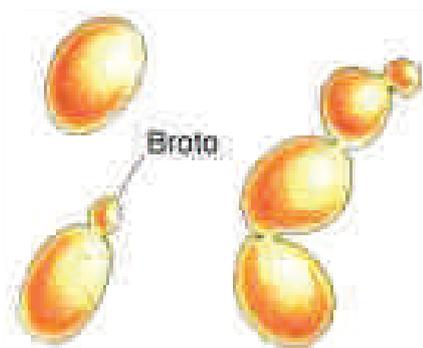


Figura 44 - Broto ou gema.

- **Sexuada**

A reprodução sexuada de leveduras ocorre através de esporos endógenos -ascósporos (fig. 45), contidos no interior da célula-mãe. Os ascósporos são geralmente em número de 4 a 8, variando de acordo com a espécie envolvida: são esféricos em *Saccharomyces cerevisiae*, anelados (anel de Saturno) em *Hansenula saturnus*, alongadas com flagelos em *Nematospora*, etc.

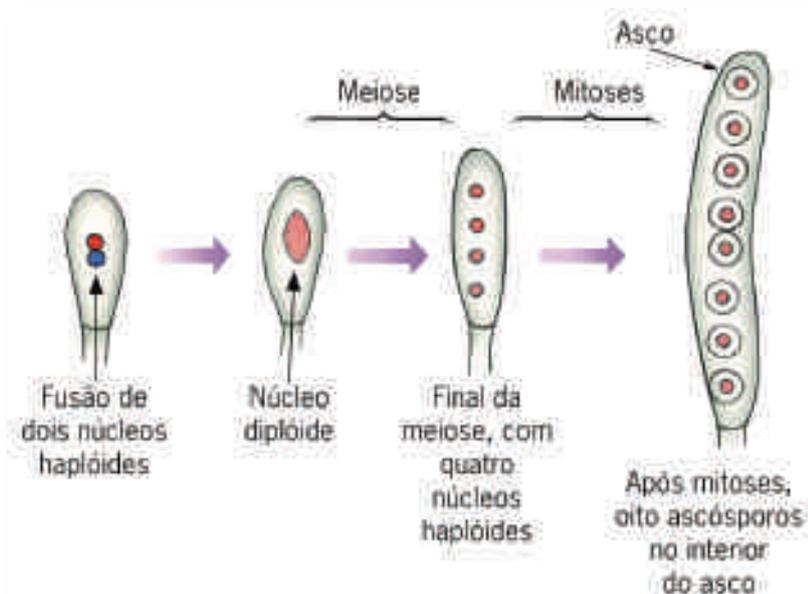


Figura 45 - Formação de ascósporos.



CLASSIFICAÇÃO

Atualmente, a classificação das leveduras baseia-se nas características reprodutivas (sexuada ou assexuada), bem como na capacidade de utilização de certos hidratos de carbono.

A família Sporobolomycetaceae apresenta blastósporos, considerados por algumas micologistas como sendo o basidiósporo. Pertencem a esta família os géneros *Sporobolomyces* e *Bullera*. Por fim a família *Cryptococcaceae* agrupa leveduras que se reproduzem unicamente por gemulação ou por cissiparidade. Os principais representantes pertencem aos géneros *Torulopsis* e *Rhodotorula*.

Apresentam maior interesse os seguintes géneros e espécies de leveduras:

- *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ellipsoideus* e *Saccharomyces calbergensis*, agentes normais da fermentação alcoólica.
- *Zygosaccharomyces*, com capacidade de desenvolverem-se em líquidos com alta concentração de açúcar. São, por isso, responsáveis pela deterioração de mel, melaço e xaropes.
- *Schizosaccharomyces*, muito comum na superfície de frutos, no solo, no bagaço e em substratos.
- *Picchia*, *Hansenula* e *Debaryomyces*, responsáveis pela formação de filmes na superfície de líquidos de origem vegetal e de ácidos.
- *Saccharomyces*, leveduras apiculadas, indesejáveis na fermentação da uva para produção de vinho.
- *Endomyces vernalis*, utilizado na síntese de produtos gordos.
- *Endomyces fiberliger*, levedura capaz de produzir amilase.

Vírus

No mundo dos microrganismos um outro grupo distingue-se significativamente dos outros tipos de microrganismos, os vírus, pois não possuem metabolismo independente. São constituídos por uma espécie de cápsula proteica que encerra o seu material genético (DNA ou RNA).

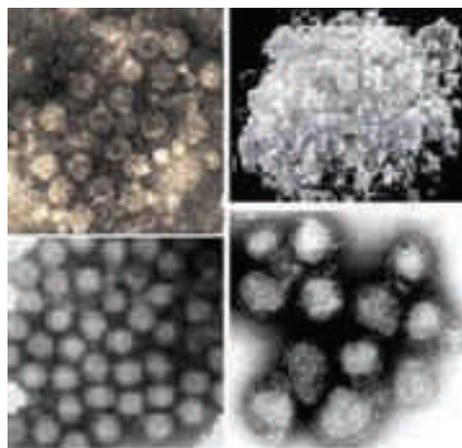
No material genético encontram-se instruções para a replicação do vírus que só ocorre no interior de células hospedeiras vivas.



Um vírus pode ser transmitido através do ar, de gotas de água, de comida ou por contato direto. Quando um entra em contato com uma célula, ele força a entrada na célula e o escudo protetor que se encontra a envolver o vírus dissolve-se. Por sua vez, o centro do vírus toma conta do núcleo da célula hospedeira e recombina os códigos da célula para que esta reproduza vírus. São assim reproduzidos vírus a partir das células. Normalmente, as células hospedeiras morrem.

Os vírus (fig. 46) podem provocar várias doenças como, por exemplo, a Gripe, a Hepatite e a Sida.

Figura 46 - Alguns tipos de vírus: a) Vírus da Hepatite, b) Vírus da Sida (VIH), c) Rotavírus, d) Vírus da gripe.



Os vírus são de dimensão sub-microscópica (15-400 nm³) pelo que só são visíveis de forma clara ao microscópio eletrónico.

Os vírus são agentes responsáveis por um grande número de gastroenterites em todo o mundo. Apesar da principal via de contágio ser pessoa-pessoa, os alimentos são um veículo muito significativo na transmissão destas doenças.

As gastroenterites víricas têm sido subestimadas ao longo dos anos, principalmente por falta de meios de diagnóstico. A utilização de técnicas de biologia molecular nos estudos epidemiológicos e, possivelmente, na pesquisa de vírus em alimentos contaminados irá contribuir no futuro próximo para o reconhecimento dos vírus como um grupo importante de organismos patogénicos veiculados por alimentos.

É de salientar a ocorrência de vários surtos de doenças de origem alimentar associados ao consumo de alimentos contaminados com vírus de *Norwalk*, *Rotavírus* (vírus causador de diarreias em crianças com menos de 5 anos), vírus de *Hepatite A* e *Astrovírus* (vírus responsável por gastroenterites).

Os vírus não se multiplicam na água ou nos alimentos. Assim, a contaminação ocorre no local da produção, por contato de alimentos com águas e efluentes poluídos ou durante a manipulação, preparação e distribuição por manipuladores infetados.



Algas Unicelulares

Algumas espécies de algas unicelulares (fig. 47), que fazem parte do fitoplâncton, produzem toxinas, que se acumulam principalmente nos bivalves (amêijoas, berbigões). Estas algas desenvolvem-se, com maior incidência, nas épocas do ano em que a luminosidade e a temperatura são mais elevadas.

As toxinas não têm cor, cheiro nem sabor e nem sempre são destruídas pelos processos culinários.

Para prevenir as intoxicações provocadas por estas toxinas, só se devem consumir bivalves que tenham sido apanhados em locais autorizados e comercializados após terem sido depurados.

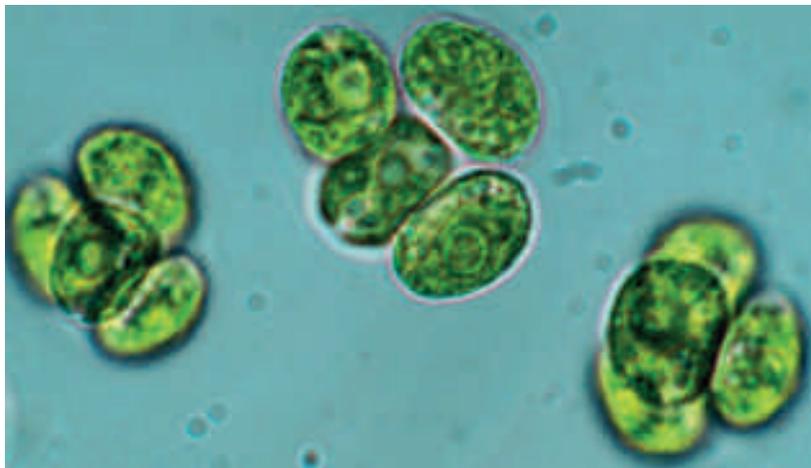


Figura 47 - Alga Unicelular - *Chorella*.

Protozoários

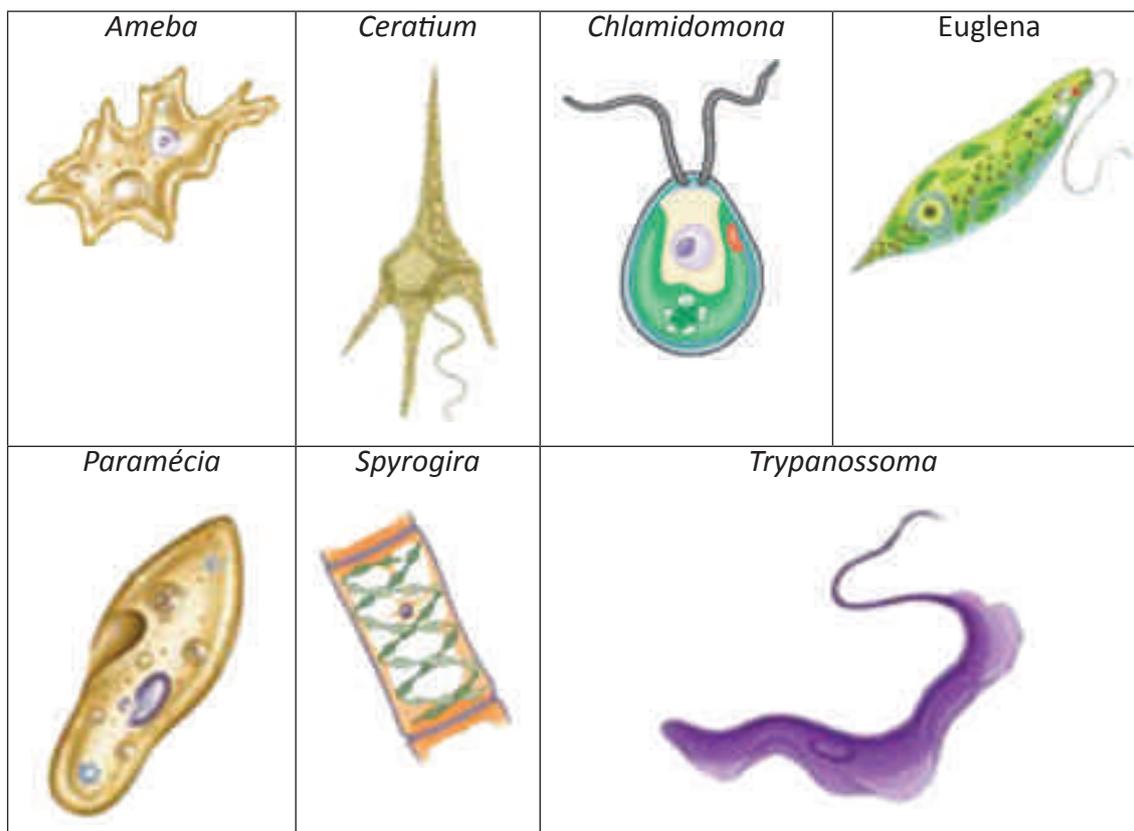
Existem quase 30000 espécies conhecidas de protozoários, microrganismos unicelulares que vivem sobretudo em ambientes aquáticos.

Os protozoários apresentam uma estrutura bastante complexa: todas as funções vitais como a alimentação, a excreção, a reprodução e a respiração têm lugar numa única célula. Podem ser parasitas mas a maior parte apresenta vida livre.

A sua mobilidade é conferida por diferentes tipos de estruturas. Muitos são microscópicos, embora alguns sejam visíveis a olho nu. Quanto à forma, os protozoários têm uma variedade incrível, desde a simples ameba, semelhante a uma bolha, até aos que estão equipados com estruturas complicadas para apanharem presas, para se alimentarem e para se deslocarem.



Quadro 1 - Algumas formas de protozoários



Como parasitas do homem e de outros seres vivos, podem causar muitas doenças graves, por exemplo, a doença de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi* (fig. 48, c), a amebíase (fig. 48, a), a giardíase (fig. 48, b) e a malária (fig. 48,d).

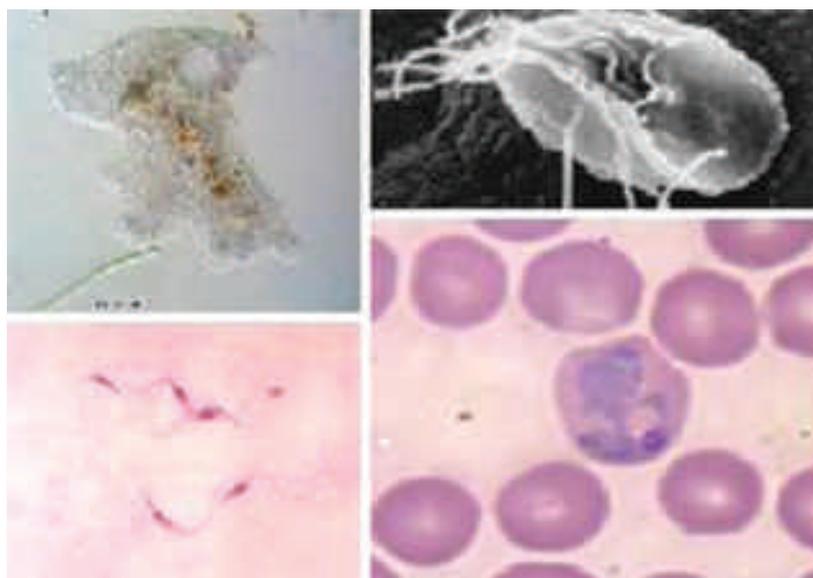


Figura 48 - Alguns protozoários causadores de doenças. a) amebíase; b) giardíase; c) *Trypanosoma cruzi*; d) malária.



Uma das doenças transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados com protozoários é a toxoplasmose. Se em grande parte dos casos, a doença passa facilmente despercebida, na mulher grávida a toxoplasmose provoca graves lesões oculares e nervosas no feto, que comprometem a sua sobrevivência.



Atividades – Exercícios

1. Desde as primeiras observações de Antony van Leeuwenhoek com o seu microscópio rudimentar que o homem pode observar seres microscópicos com vida.
O que são microrganismos?
2. Qual a função da taxonomia?
3. Quais os domínios da Taxonomia?
4. Qual a classificação das bactérias quanto à forma?
5. A classificação Gram é muito usada para identificar bactérias. É feita com base numa técnica de coloração desenvolvida pelo microbiologista dinamarquês Hans Christian Gram. A técnica de Gram permite dividir as bactérias em dois grupos, devido às características distintas da membrana e parede.
Explique as diferenças entre bactérias Gram + e Gram -.
6. Os fungos podem viver nas mais variadas temperaturas, entre 60°C a -10°C. Como são heterotróficos, alimentam-se de matéria orgânica (viva ou morta). Desenvolvem-se bem em locais húmidos e de sombra. De acordo com o modo como obtêm alimento, podem ser classificados em três grandes grupos.
Indique e explique as diferenças destes três grupos de fungos.
7. Os bolores são seres pluricelulares, que se tornam visíveis a olho nu, quando se multiplicam sobre os alimentos (por exemplo, o bolor da fruta). Alguns deles são especialmente perigosos para a saúde, devido à produção de toxinas.
Explique a constituição dos bolores ou fungos filamentosos.



8. Nos bolores ou fungos filamentosos a divisão das hifas pode ocorrer de dois modos.

Indique os dois modos de divisão das hifas.

9. As leveduras, tal como os bolores, são fungos, mas diferenciam-se por se apresentarem predominantemente, sob a forma unicelular. Como células simples, as leveduras crescem e reproduzem-se mais rapidamente do que os bolores e também são mais eficientes nas alterações químicas que provocam nos alimentos.

Indique algumas das características das leveduras que as diferenciam dos outros fungos.

10. Os protozoários apresentam uma estrutura bastante complexa: todas as funções vitais como a alimentação, a excreção, a reprodução e a respiração têm lugar numa única célula. Podem ser parasitas mas a maior parte apresenta vida livre.

Indique alguns exemplos de doenças causadas por protozoários.



2. NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

Como se multiplicam os Microrganismos?

A maior parte dos microrganismos multiplica-se por fissão binária (fig. 49) ou por gemulação, ou seja, uma célula dá origem a duas ao fim de um certo tempo (tempo de duplicação). O tempo de duplicação depende de microrganismo para microrganismo e de acordo com as condições do ambiente em que se encontra. Em condições muito favoráveis, alguns microrganismos podem duplicar em 20 minutos: ou seja, cada célula forma uma nova célula, de 20 em 20 minutos.

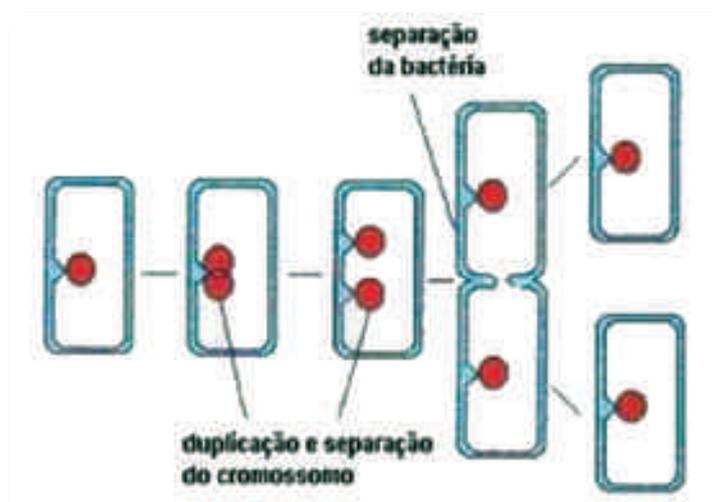


Figura 49 - Duplicação bacteriana.

Os microrganismos, como todos os seres vivos, têm condições ótimas de desenvolvimento. Quando se conhecem os fatores que favorecem e/ou inibem o seu desenvolvimento, é possível controlar o seu crescimento em alimentos.

Cada microrganismo tem condições específicas de temperatura, de humidade, de pH, de atmosfera gasosa envolvente e de nutrientes para atingir o seu desenvolvimento ótimo, ou seja, condições para as quais a sua duplicação ocorre a uma maior velocidade.

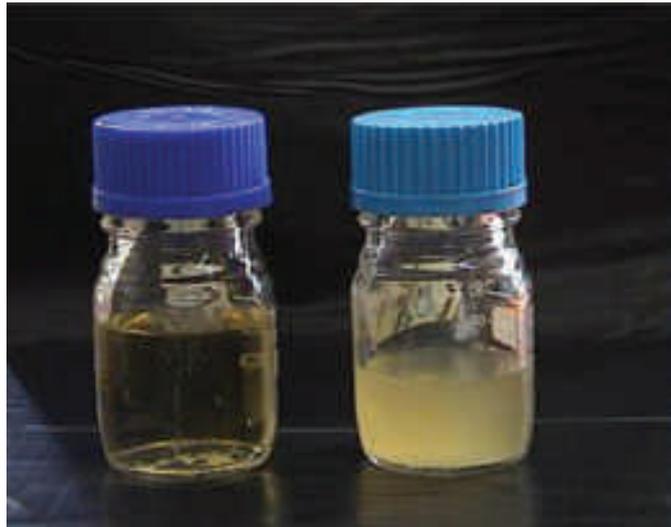
Crescimento de microrganismos em laboratório

Em laboratório é necessário recorrer a meios de cultura para cultivar (fazer crescer) diversos microrganismos.



O meio de cultura é uma solução que contém os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos no laboratório. Alguns microrganismos crescem sem dificuldade em qualquer meio de cultura, outros necessitam de meios especiais e existem ainda aqueles que não são capazes de crescer em nenhum dos meios desenvolvidos até ao momento. Os meios de cultura podem apresentar-se no estado líquido (fig. 50) ou sólido. No caso dos meios líquidos, à medida que os microrganismos se vão multiplicando aumenta a turvação do meio. Sabendo a turvação, por medição em aparelhos especiais (espectrofotómetros), é possível estimar o número de microrganismos.

Figura 50 - Fotografia de meios de crescimento líquidos. Um dos meios líquidos está turvo porque ocorreu crescimento de microrganismos.



No caso dos meios sólidos (meio líquido solidificado com agar - aparência de gelatina) (fig. 51), o crescimento é avaliado pela formação de colónias (à medida que se vão multiplicando, vão-se formando aglomerados de microrganismos, que quando atingem um número suficientemente elevado se tornam visíveis a olho nu). O número de microrganismos é estimado com base no princípio de que um microrganismo vai dar origem a uma colónia.



Figura 51 - Fotografia de meios de crescimento sólidos. Os pontos claros que aparecem numa das placas comprovam que ocorreu crescimento de microrganismos (formação de colónias).



Noções básicas sobre crescimento microbiano. Expressão matemática. Fases do crescimento de uma população bacteriana. Fatores que afetam o crescimento de populações microbianas: concentração de nutrientes, temperatura, pressão osmótica, composição da fase gasosa, pH, a_w , etc.

Fatores que afetam o crescimento microbiano

Os alimentos são uma fonte excelente de substratos onde se desenvolvem numerosas espécies e variedades de microrganismos devido aos vários fatores.

2.1. Fatores Intrínsecos

Caraterísticas associadas aos próprios alimentos:

1. Atividade da Água;
2. pH;
3. Potencial de Oxi-redução;
4. Composição do alimento - conteúdo em nutrientes;
5. Agentes antimicrobianos
6. Estruturas biológicas

1 - A água

A água é indispensável para o crescimento dos microrganismos. Em determinadas situações, embora presente em grandes quantidades, a água encontra-se ligada a certos compostos, por exemplo, o açúcar ou o sal, o que inviabiliza o crescimento de microrganismos. Um exemplo dessa situação é a fruta em calda, que tem uma grande quantidade de água. Contudo não pode ser utilizada para o crescimento dos microrganismos porque está ligada ao açúcar adicionado. Se em vez de açúcar se adicionasse sal, o efeito seria semelhante.

A água ligada encontra-se intimamente associada às moléculas constituintes do produto, não sendo removida ou utilizada em qualquer tipo de reação, assim o metabolismo dos microrganismos fica paralisado não ocorrendo reprodução ou desenvolvimento microbiano.



A água livre encontra-se disponível para as reações físicas (ex. evaporação), químicas (ex. escurecimento) e microbiológicas, sendo o fator principal da degradação alimentar. Quando não existe água livre, a medida de atividade da água (a_w) será igual a $a_w = 0,000$ e a totalidade de água pura livre corresponde a $a_w = 1,000$.

A **atividade da água** (a_w) é definida como a relação da pressão de vapor da solução P (soluto em água) e a P_0 (pressão de vapor do solvente). O crescimento e o metabolismo microbiano exigem a presença de água numa forma disponível, pelo que os microrganismos têm comportamento variável conforme o valor de a_w .

As bactérias são mais exigentes do que os bolores e leveduras. E a maioria dos microrganismos deterioradores não crescem em meios com $a_w < 0,91$.

Quadro 2 - a_w e o crescimento microbiano.

Categoria	a_w	Caraterísticas
Baixa a_w	< 0,60	Microrganismos estáveis.
a_w Intermediária	0,60 - 0,85	Sujeito a deterioração fúngica ou por bactérias halófilas (meios salinos).
a_w Elevada	> 0,85	Deterioração fúngica e/ou bacteriana; Crescimento de bactérias patogénicas.

2 - O pH

O pH é uma medida da acidez ou alcalinidade de uma solução. A escala de pH (fig. 52) varia de 1 (valor de pH mais baixo) a 14 (valor de pH mais elevado). A maioria das bactérias cresce melhor em ambientes próximos da neutralidade (pH 6,0 - 8,0). Poucas bactérias são capazes de crescer em pH ácido (pH 4,0). Os bolores e as leveduras são na generalidade os microrganismos mais tolerantes ao ácido, desenvolvendo-se em ambientes com valores de pH de 3,5 - 4,0 e 4,5 - 6,0 respetivamente.

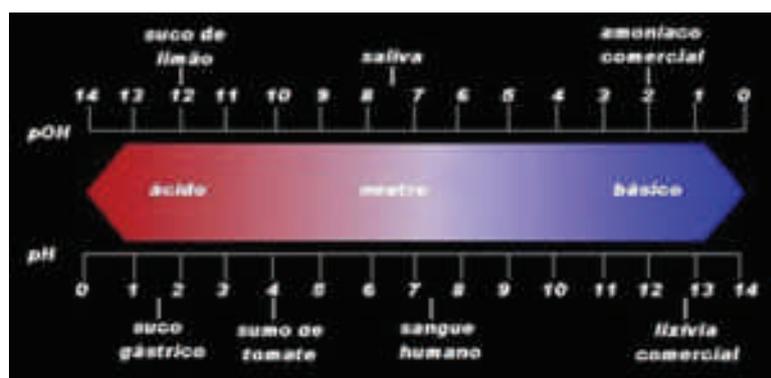


Figura 52 - Escala de pH.



O pH do alimento é um dos principais fatores intrínsecos capazes de determinar o crescimento, sobrevivência ou destruição dos microrganismos presentes no alimento.

Classificação quanto a acidez:

- **Alimentos de baixa acidez** (pH > 4,5)

Nestes alimentos predomina o crescimento bacteriano face a menor tempo de geração, envolvendo tanto espécies deteriorantes como patogénicas, aeróbias ou anaeróbias, mesófilas ou termófilas. Exemplos destes alimentos são produtos cárneos e marinhos, leites e alguns vegetais.

- **Alimentos Ácidos** (pH entre 4,5 e 4,0)

Predomina o crescimento de leveduras oxidativas ou fermentativas e de bolores; algumas bactérias esporoladas (*Clostridium sp.*); ou bactérias não esporoladas (*Lactobacillus*, *Streptococcus*). Alimentos como exemplo são as frutas, tais como tomate, pêra.

- **Alimentos de elevada acidez** (pH < 4,0)

O crescimento microbiano é praticamente restrito às leveduras e bolores, no entanto podem desenvolver-se algumas bactérias lácticas ou acéticas. As frutas, sumos de frutas, pickles, chucrute são alguns exemplos de produtos alimentares com elevada acidez.

3 - Potencial de Oxi-redução

O potencial de oxi-redução é uma medida da tendência que um sistema reversível tem de doar ou receber electrões. Mede a facilidade com que o substrato cede ou capta electrões:

Oxidação - doação de electrões, o substrato fica oxidado. Quanto mais oxidado um alimento mais positivo é o potencial de oxi-redução.

Redução - captação de electrões, o substrato fica reduzido. Quanto mais reduzido um alimento mais negativo é o potencial de oxi-redução.

Potenciais de oxi-redução positivos (elevados) favorecem o crescimento de microrganismos aeróbios. Potenciais de oxi-redução negativos (baixos) favorecem o crescimento de microrganismos anaeróbios. Os microrganismos facultativos desenvolvem-se em ambos.



- **Aeróbios** - Tem como potencial ótimo de crescimento, valores entre + 350 a + 500 mV;
- **Anaeróbios facultativos** - Crescem tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, em virtude disso tem uma capacidade de crescimento em valores mais reduzidos de potencial (+ 100 a + 350 mV)
- **Anaeróbios** - Tem uma capacidade de crescerem em potenciais baixos (+ 30 a - 250 mV);

4 - Composição do alimento

Para além da água, os microrganismos, tal como nós, necessitam de fontes de nutrientes e de energia. Estas necessidades podem ser satisfeitas utilizando os mesmos alimentos que ingerimos. Assim, em alimentos nutritivos (como o leite, a carne ou o peixe), os microrganismos podem desenvolver-se com muita facilidade.

A composição do alimento vai ser responsável pelo fornecimento dos substratos utilizados pelos microrganismos nas diversas atividades metabólicas.

Os alimentos ricos em hidratos de carbono e açúcares têm uma tendência maior para a proliferação de microrganismos.

Os microrganismos utilizam açúcares, álcoois e aminoácidos, alguns microrganismos são capazes de utilizar hidratos de carbono complexos como o amido e a celulose, transformando-os em hidratos de carbono mais simples. Os lípidos podem servir como fonte de energia contudo somente são metabolizados por alguns microrganismos. Alguns microrganismos conseguem metabolizar nucleotídeos e outros metabolizam peptídeos, como fonte de azoto.

Os nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano são: água, fontes de energia, fontes de azoto, vitaminas e sais minerais.

A composição do alimento associa a quantidade de água disponível, o pH, os nutrientes, os agentes antimicrobianos naturais, a interação entre microorganismos, etc.

5 - Agentes Antimicrobianos

Alguns alimentos são mais estáveis ao ataque por microrganismos, isto deve-se à presença de substâncias inibidoras que dificultam a sua proliferação ou multiplicação, estas substâncias podem ser:



- Naturais
- Produzidas por microrganismos (quadro 3)
- Adicionadas ao alimento (conservantes)
- Competição entre microrganismos
- Estrutura biológica do alimento

Os agentes antimicrobianos naturais são o eugenol presente no cravinho (fig. 53) e na canela; a alicina do alho; o aldeído cinâmico da canela; timol e isotimol dos orégãos; a lizosima da clara do ovo; a lactoferrina do leite.



Figura 53 - Cravinho da Índia e planta do cravinho da Índia.

Quadro 3: Substâncias inibidoras produzidas por microrganismos

Substância	Microrganismo
Ácido propiónico	Bactéria propiónica do queijo tipo suíço
Ácido láctico	Bactéria láctica
Álcool	Levedura
Antibiótico	Bolores
Bacteriocinas	vários, especialmente bactérias gram positivas
Nisina	<i>Streptococcus lactis</i> , inibe o crescimento de espécies de <i>Clostridium</i> produtora de gás, que fermentam os latatos durante a maturação dos queijos, retardando a maturação
Água Oxigenada	Estreptococos e lactobacilos



Os aditivos alimentares como ácidos, nitratos, dióxido de enxofre e sulfitos, quando adicionados aos alimentos podem reduzir ou mesmo inibir o crescimento microbiano. A adição de microrganismos inofensivos estimula o processo competitivo. Por exemplo as bactérias lácticas inibem o crescimento de bactérias Gram negativas.

6 - Estruturas Biológicas

A casca que reveste os frutos, a pele dos animais e a casca dos ovos são estruturas biológicas que revestem naturalmente muitos alimentos sendo proteção contra a entrada e o desenvolvimento dos microrganismos.

2.2. Fatores Extrínsecos

Caraterísticas exteriores ao alimento:

1. Temperatura;
2. Atmosfera envolvendo o alimento, presença e concentração de gases no meio ambiente;
3. Humidade relativa do ambiente
4. Presença e atividade de outros microrganismos

1 - A temperatura

A temperatura tem uma forte influência no crescimento microbiano.

A maioria dos microrganismos patogénicos apresenta um crescimento máximo à temperatura do corpo humano. Mas os microrganismos são muito mais flexíveis do que nós no que respeita à temperatura necessária para o seu funcionamento e desenvolvimento.

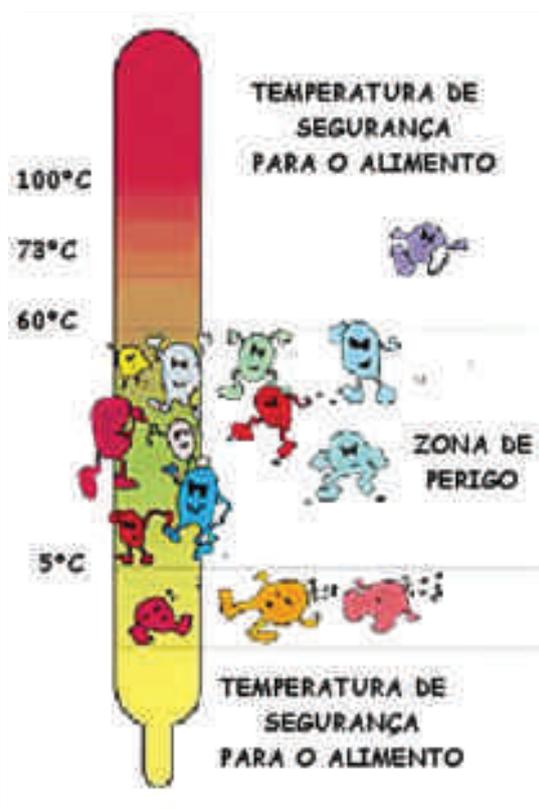
O crescimento bacteriano é possível a temperaturas inferiores a 0°C e superiores a 100°C. No entanto, nenhum organismo consegue multiplicar-se nesta amplitude de temperatura. A maior parte das bactérias encontradas em alimentos conseguem crescer entre os 5°C e os 50°C (existem algumas exceções). No entanto, a sua temperatura de crescimento ótima (temperatura à qual a velocidade de crescimento é máxima) situa-se entre os 30 e os 40°C.



A temperaturas baixas os microrganismos crescem muito lentamente (por exemplo no frigorífico, 4°C) ou ficam inativos (por exemplo, no congelador, -18°C) mas não morrem. A fervura (100°C), durante 15 a 30 minutos destrói a maioria das bactérias, no entanto não destrói os esporos.

Algumas bactérias são capazes de crescer em temperaturas extremas (>100°C ou <0°C), às quais a maior parte dos outros seres vivos não sobreviveria (fig. 54).

Figura 54 - Termómetro de segurança dos alimentos.



Os microrganismos têm temperaturas ótimas de crescimento (quadro 4) de acordo com as suas características de adaptação a temperaturas variadas.

Quadro 4: Grupos de microrganismos em função da Temperatura

Grupo	Temperatura (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
Termófilos	40-45	55-75	60-90
Mesófilos	5-15	30-45	35-50
Psicrófilos	-5 a +5	12-15	15-20
Psicrotrófilos	-5 a +5	25-30	30-35

2 - Concentração de gases atmosféricos

O oxigénio (O_2) representa cerca de 21% da composição da atmosfera terrestre e é o gás que mais condiciona o desenvolvimento de microrganismos nos alimentos. De acordo com a necessidade de O_2 , os microrganismos são divididos em 4 grupos:



Aeróbios Obrigatórios - requerem oxigênio para o seu crescimento (21% de O_2). Alguns podem crescer mais lentamente quando o O_2 é limitado. Em meio líquido os microrganismos podem rapidamente utilizar o O_2 dissolvido na camada superficial do meio. Ex: Bolores, leveduras oxidativas e bactérias (Pseudomonas, Moraxella etc..)

Aeróbios Facultativos - Crescem na presença de O_2 (maior produção de energia) ou podem também crescer em anaerobiose (sem oxigênio). Ex: Enterobactérias.

Microaerófilicos - Crescem em pequena concentração de oxigênio (+/- 10 %) Ex: Lactobacilos e Estreptococos.

Anaeróbios - são aqueles que não apresentam atividade metabólica na presença de O_2 . Contudo alguns, por exemplo, *Clostridium perfringens* - podem tolerar baixas concentrações de oxigênio.

Anaeróbios Tolerantes - na presença de quantidade de pequenas percentagens de oxigênio, assim como na sua ausência produzem igual quantidade de energia.

Anaeróbios Estritos - não sobrevivem na presença de oxigênio.

O uso de atmosferas controladas envolvendo os alimentos em misturas de gases, poderá alterar o tempo de vida de um alimento, sendo portanto uma das opções de embalagem de alguns alimentos, como por exemplo carne embalada em atmosfera modificada.

3 - Humidade Relativa do ambiente

A humidade é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento dos seres vivos, o mesmo ocorre com as bactérias. Sem água elas não podem aproveitar os nutrientes que as rodeiam, as bactérias não crescem nem se multiplicam nos alimentos desidratados mas também não morrem, quando estes são reconstituídos voltam a crescer e a multiplicar-se, pelo que se deve ter com estes alimentos os mesmos cuidados que se têm com os alimentos frescos.

Os alimentos têm tendência a absorver humidade aumentando deste modo a atividade da água (a_w). Os alimentos desidratados e com baixo a_w tendem a absorver na sua



superfície água proveniente do meio ambiente, proporcionando-se aí o desenvolvimento de microrganismos, por exemplo, farinha, bolachas (fig. 55).



Figura 55 - Bolachas.

4 - Atividade de outros microrganismos

A competição pelos nutrientes pode impedir o desenvolvimento de outras bactérias, como por exemplo as bactérias lácticas. As alterações do pH verificadas durante o desenvolvimento dos microrganismos pode favorecer ou condicionar o desenvolvimento de outras espécies.



Atividades – Exercícios

1. Os alimentos são uma fonte excelente de substratos onde se desenvolvem numerosas espécies e variedades de microrganismos devido aos vários fatores. Indique os fatores que afetam o crescimento microbiano.
2. Qual a importância da atividade da água (aW) para o crescimento dos microrganismos?
3. Os alimentos podem apresentar acidez variável. Indique a classificação dos alimentos quanto à acidez.
4. A temperatura tem uma forte influência no crescimento microbiano. Como é que a temperatura afeta o crescimento microbiano?
5. Os microrganismos têm temperaturas ótimas de crescimento de acordo com as suas características de adaptação a temperaturas variadas. Indique a classificação dos microrganismos quanto à temperatura.
6. A presença de oxigénio ou a sua ausência pode condicionar o desenvolvimento microbiano. Indique a classificação dos microrganismos quanto à necessidade ou não de oxigénio.



3. MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS

3.1. Ação dos microrganismos na conservação

Na natureza a interação dos microrganismos com animais e plantas é uma constante natural. Uma vez que os alimentos que consumimos têm a sua origem no reino animal e no reino vegetal é provável a presença de microrganismos que interagem com eles. Assim como nós necessitamos de alimentos também os microrganismos necessitam e para suprimir essa necessidade utilizam os nossos alimentos como fontes de nutrientes para o seu próprio crescimento e, como consequência, os alimentos sofrem alterações. Estas alterações podem ser positivas quando ocorre um melhoramento das características dos alimentos alterados, ou podem ser negativas, quando ocorre a deteriorização dos alimentos.

As fermentações são um exemplo de alterações benéficas para o alimento, porque conduzem à melhoria das propriedades organolépticas. Como exemplo de alterações negativas temos o caso dos microrganismos causadores de putrefação dos alimentos ou o caso dos microrganismos patogênicos, que utilizam os alimentos como substrato para se desenvolverem e multiplicarem-se, o que torna estes alimentos perigosos para a saúde pública.

As características do alimento determinam qual a flora microbiana que pode desenvolver-se nele, porque o substrato do alimento determina se o microrganismo pode ou não desenvolver-se naquele alimento. Daí ser importante conhecer os fatores que favorecem ou inibem a multiplicação dos microrganismos e deste modo compreender os princípios básicos que regem quer a alteração quer a conservação dos alimentos. Estes fatores são o pH, a humidade, o potencial redox, os nutrientes e a presença de substâncias inibidoras (bioquímicas ou físicas).

Cada um destes fatores é importante na definição da flora microbiana que se vai desenvolver no alimento, mas também as suas interações devem ser tidas em conta quando se pensa num alimento em termos globais. Por exemplo, um microrganismo que cresce a um pH próximo do seu valor ótimo tolerará melhor variações de humidade que um outro que cresça a valores pH afastados do ideal. Com o fim de impedir ou retardar o desenvolvimento de microrganismos, podem manipular-se vários destes fatores simultaneamente, o que será mais eficaz do que intervir separadamente em cada um deles.



Em microbiologia alimentar encontramos exemplos importantes de interações com os alimentos, de membros dos tipos clássicos de microrganismos: bolores, leveduras, bactérias, archaea e vírus, estes dois últimos são os únicos que apresentam ações prejudiciais, os restantes podem apresentar alterações benéficas ou não, por parte dos microrganismos que as compõem.

A interação existente entre os microrganismos e os alimentos pode ser classificada em três grupos:

1 - Microrganismos como agentes de deterioração dos alimentos - causam alterações químicas indesejáveis deteriorando o alimento e alterando a cor, sabor, odor, textura e o aspeto do alimento.

Alimentos deteriorados: São aqueles alimentos danificados (fig. 56) por agentes microbiológicos, químicos ou físicos, de modo que seja inaceitável para o consumo humano.

- Aproximadamente 20% das frutas e dos vegetais colhidos são perdidos por deterioração microbiana produzida por aproximadamente 250 doenças conhecidas no mercado.
- Os agentes causadores de deterioração podem ser bactérias, fungos e leveduras, sendo as bactérias e os fungos os mais importantes.
- As carnes são os alimentos mais facilmente deteriorados.
- Durante o processo da deterioração é selecionada uma população ou tipo predominante de microrganismos.
- Cada tipo de alimento deteriora-se pela ação de um tipo concreto de microrganismo.
- De todos os microrganismos presentes num alimento, só alguns são capazes de se multiplicar ativamente no alimento resultando numa seleção.



Figura 56 - Laranja a iniciar decomposição por ataque de microrganismos.



2 - Microrganismos como agentes patogênicos transmitidos por alimentos - causam risco à saúde do consumidor.



3 - Microrganismos como produtores de alimentos - utilizados na fabricação de alimentos (vinhos, queijos (fig. 57), pães, cerveja, etc.).

Figura 57 - Queijos e vinho.

Fontes de Contaminação

- **SOLO E ÁGUA:** microrganismos do solo podem contaminar o ar através dos ventos e posteriormente chegar aos corpos hídricos através das chuvas. Os microrganismos aquáticos podem ser transferidos para o solo através das nuvens e posteriormente pela chuva, portanto são quase os mesmos. No entanto, alguns microrganismos das águas marinhas são incapazes de sobreviver no solo devido à necessidade da salinidade (ex. *Alteromonas spp.*). A flora bacteriana da água do mar é formada por microrganismos Gram negativos e alguns Gram-positivos.
- **PLANTAS:** poucos microrganismos presentes no solo e água têm a capacidade de sobreviver e multiplicar-se na superfície das plantas porque não têm mecanismos de adesão e nutrientes necessários. Porém, alguns são fitopatogênicos: *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e alguns fungos.
- **UTENSÍLIOS:** bandejas, panos, tábuas, peças de moagem em máquinas. Limpeza e desinfecção inadequadas ou feitos de material inapropriado, podem resultar em CONTAMINAÇÃO CRUZADA.
- **TRATO INTESTINAL DO HOMEM E DE ANIMAIS:** rico em microrganismos, em quantidade e variedade, são a principal fonte de contaminação de enteropatogênicos como: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* e muitos outros.



- **MANIPULADORES DE ALIMENTOS:** mãos, roupas (podem conter microrganismos do solo e água), fossas nasais, boca e pele. Manipuladores com higiene precária podem contaminar os alimentos com microrganismos do trato intestinal.
- **RAÇÃO ANIMAL:** importante fonte de *Salmonella* para aves e outros animais e a *Listeria monocytogenes* na silagem de forragens.
- **PELE DOS ANIMAIS:** principal fonte de contaminação do leite, quando não se tem a higiene e os cuidados necessários.
- **AR E PÓ:** embora todos microrganismos possam ser encontrados no ar os que melhor sobrevivem são as bactérias Gram positivas e os fungos.

3.2. Efeitos dos fungos (bolors e leveduras) na Indústria Agroalimentar

Os fungos são formados pelos bolors e leveduras como já vimos anteriormente.

Os bolors são, na sua maioria, aeróbios, pelo que o seu crescimento se verifica na superfície dos alimentos. São formados por filamentos denominados hifas, que em conjunto formam o micélio. As hifas podem ser septadas e intercomunicar-se através dos poros; e não septada com os núcleos celulares dispersos ao longo de toda hifa (fig. 58). Quanto às características fisiológicas são menos exigentes que as leveduras e bactérias em relação a humidade, pH, temperatura e nutrientes. O micélio pode ter duas funções: promover a fixação ao substrato, e a reprodução através da produção dos esporos.

Figura 58 - Hifas com esporos.



Embora grande parte dos bolors intervenha na contaminação de muitos alimentos, algumas espécies são úteis na transformação benéfica de alguns alimentos. Por exemplo, os queijos Roquerfort, Camembert e Brie são produzidos com o auxílio de bolors,



utilizando-se também alguns destes microrganismos na elaboração do molho de soja, do *miso* e do *sonti* (alimentos orientais).

Em comparação com outros microrganismos, leveduras e bactérias, os bolores necessitam de menor humidade disponível (a_w) para o seu crescimento. Outras características fisiológicas dos bolores são:

- Capacidade de crescer a temperaturas próximas da ambiente (25- 30°C), sendo por isso considerados mesófilos. Contudo, alguns são capazes de desenvolver-se a temperaturas um pouco mais elevadas, ou mesmo bastante mais elevadas (termófilos), enquanto outros podem viver a temperaturas de refrigeração ou mesmo a menos de 0°C (psicrótrofilos).
- Necessidade de oxigénio para o seu crescimento (aeróbios).
- Capacidade de viver a valores muito variados de pH (2 a 8,5), embora a maioria cresça melhor a pH ácido.
- Capacidade de utilizar uma vasta gama de alimentos, dos mais simples aos mais complexos, já que a maioria possui enzimas hidrolíticas, capazes de degradar os alimentos mais complexos nos seus nutrientes.
- Produção de substâncias inibidoras de outros microrganismos, como por exemplo a penicilina de *Penicillium chrysogenum*.

O início do crescimento dos bolores é mais lento que o das leveduras e o das bactérias, sendo portanto os últimos a crescer quando as condições de meio são propícias ao desenvolvimento de todos os tipos de microrganismos. Contudo, uma vez iniciado o seu crescimento, este pode ser muito rápido.

O crescimento dos bolores pode ser inibido pela utilização de micostáticos, como o ácido sórbico, os propionatos ou os acetatos. A destruição dos bolores consegue-se através da utilização de fungicidas.

Principais Géneros de Bolores de interesse na Indústria Alimentar

- ***Absidia*** (fig. 59) - parecidos com a *Rhizopus*, da qual diferenciam-se por terem esporângios mais pequenos e em forma de pêra.



Figura 59 - *Absidia*.



- **Alternaria** (fig. 60) - têm hifas septadas e reprodução assexuada; causador da deterioração de tomates, pimentões, maçãs, frutas cítricas e carnes vermelhas, causando o escurecimento dos tecidos. Algumas espécies produzem micotoxinas.

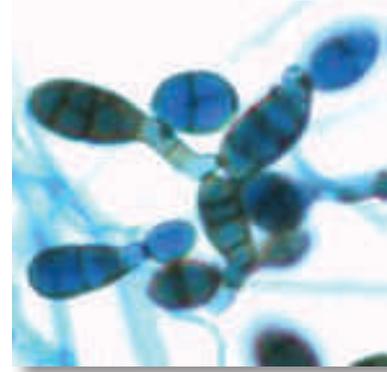


Figura 60 - *Alternaria*.

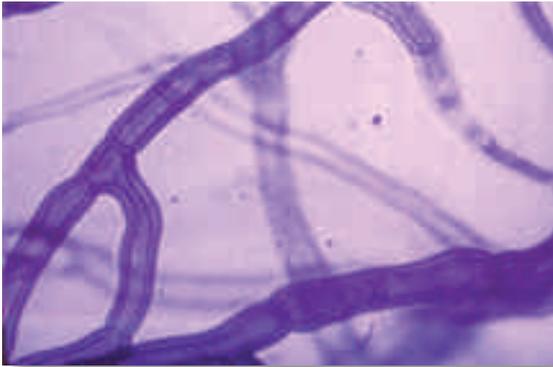


Figura 61 - Hifas de *Aspergillus*.

- **Aspergillus** (fig. 61) - este género compreende mais de 100 espécies. O seu micélio é septado e sua reprodução é assexuada. ***Aspergillus glaucus*** e ***Aspergillus repens*** causam deterioração em alimentos.

Outros como ***Aspergillus oryzae*** e ***Aspergillus soyae*** são utilizados na produção de alimentos.

O ***Aspergillus niger*** (fig. 62) é utilizado na produção comercial de ácido cítrico, glucónico e gálico, Beta-galactosidase, glicoamilase, lipases e pectinases (preparados de enzimas).

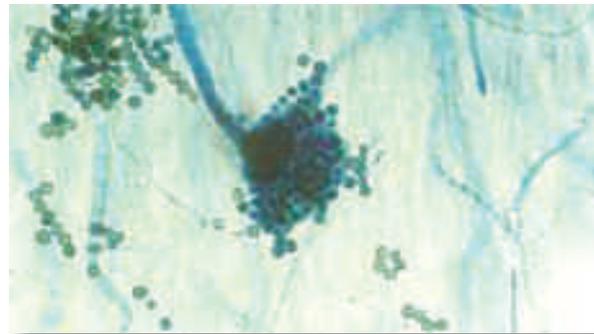


Figura 62 - *Aspergillus niger*.

Aspergillus oryzae é grande produtor de α -amilase e enzimas pectinolíticas. Tem a particularidade de possuir alguns representantes que degradam certos alimentos, ao mesmo tempo podem ser utilizados na produção de alguns alimentos orientais.

Aspergillus flavus e ***Aspergillus parasiticus*** são produtoras de micotoxina (aflatoxina, ocratoxina A e esterigmatocistina).

Os *Aspergillus* são dos bolores mais abundantes, sendo algumas espécies responsáveis por alterações dos alimentos e outras utilizadas na sua transformação. Crescem bem em alimentos ricos em açúcar ou sal, com baixo teor em humidade.



- ***Aureobasidium*** (fig. 63) - conhecido como ***Pullularia***, produz manchas pretas em camarões e carne, sendo comum em frutas e vegetais.



Figura 63 - *Aureobasidium pullularia*.

- ***Botrytis*** - tem micélio septado. ***Botrytis cinerea*** (fig. 64) é uma espécie relevante na área dos alimentos, pois ataca as uvas e provoca podridão cinza em maçãs, pêras, morangos (fig. 65) e frutas cítricas.

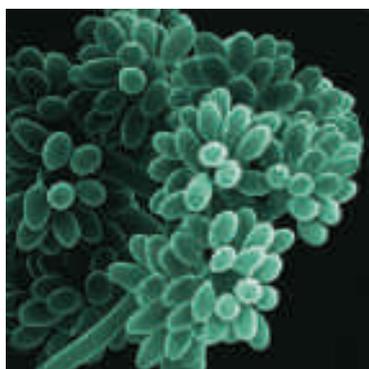


Figura 64 - *Botrytis cinerea*.



Figura 65 - Morangos com *Botrytis cinerea*.

- ***Byssochlamys*** - reprodução assexuada. Porém, as espécies ***Byssochlamys fulva*** (fig. 66) e ***Byssochlamys nivea*** produzem esporos sexuais de elevada resistência térmica, capazes de se multiplicar em pH baixo e baixa tensão de O_2 e produzir enzimas pectinolíticas muito ativas. Por isso, deterioram sucos envasados e conservas de frutas. Podem produzir gás e estufas produtos enlatados. O ***Byssochlamys fulva*** pode ser produtor de micotoxina.

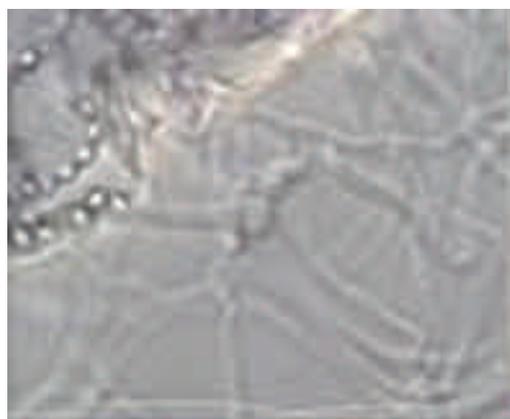


Figura 66 - *Byssochlamys fulva*.



- **Cladosporium** - as espécies mais importantes são **Cladosporium herbarum** e **Cladosporium cladosporoides**, comuns em vegetais e frutas. Podem causar alterações em carnes, manteiga e margarina. Estes microrganismos também são responsáveis pelo bolor nas paredes.



Figura 67 - *Cladosporium herbarum*.

- **Claviceps** - **Claviceps purpurea** produz alcalóides tóxicos, principalmente em grãos de cereais (fig. 68), é o agente etiológico do ergotismo, uma intoxicação aguda na idade média e controlada atualmente.



Figura 68 - Espiga de trigo contaminada com *Claviceps purpurea*.

- **Colletotrichum** - **Colletotrichum gloeosporoides** é uma espécie importante nos alimentos, responsável pela antracnose (manchas marrons ou pretas) em frutas como citrinos (fig. 69), morangos, e papaia.



Figura 69 - Limão contaminado com *Colletotrichum gloeosporoides*.

- **Fusarium** (fig. 70) - são frequentes na superfície dos alimentos. Algumas espécies causam alterações em frutas cítricas, abacaxis e figos; e outras produzem micotoxinas (zearalenona e tricotecenos).

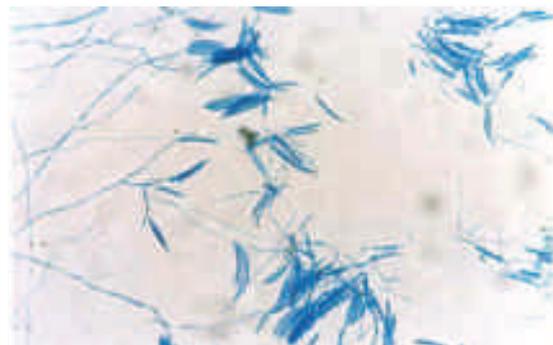


Figura 70 - *Fusarium*.



- **Geotrichum** - produzem hifas septadas com micélio de coloração branca. As espécies importantes em alimentos são **Geotrichum candidum** (fig. 71), importantes em laticínios como queijos e em máquinas de enlatar tomate, e **Geotrichum albidum**, importante em frutas.



Figura 71 - *Geotrichum candidum*.



- **Monilia** - várias espécies causam deterioração de frutas, como pêsego (fig. 72).

Figura 72 - Pêssegos contaminados por *Monilia*.

- **Mucor** - Células individuais esféricas reproduzem-se por brotamento ou gemulação. Podem ser encontrados no solo, esterco, frutas, vegetais, grãos e outros alimentos. Muitas espécies são utilizadas na produção de queijos e alimentos fermentados orientais. As espécies mais comuns encontradas nos alimentos são **Mucor pusillus**, **Mucor racemosus** e **Mucor rouxii**. O **Mucor rouxii** é utilizado industrialmente na sacarificação do amido.

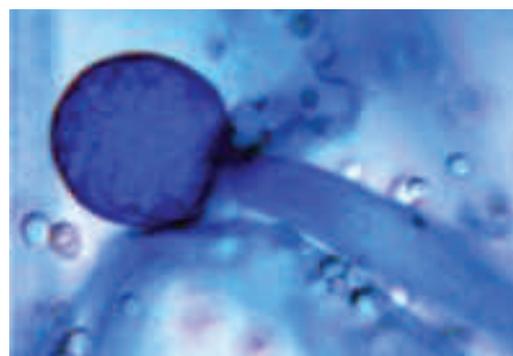


Figura 73 - *Mucor rouxii*.

- **Neurospora** - A espécie **Neurospora crassa** produz esporos sexuais que permanecem viáveis no ambiente por muitos anos. **Neurospora sitophila** (fig. 74) vulgarmente designada de



Figura 74 - *Neurospora sitophila*.



“bolor vermelho do pão” produz pigmentos de coloração rósea na superfície dos pães. Pode também ser encontrada na superfície do bagaço de cana de açúcar.

- **Penicillium** - género de numerosas espécies, muito importante nos alimentos. O seu micélio é septado e sua reprodução é assexuada. **Penicillium Cyclopium** e **Penicillium viridicatum** causam a deterioração de grãos e cereais. Várias espécies, **Penicillium expansum** provoca danos em frutos, **Penicillium digitatum** e **Penicillium italicum** provocam podridão em citrinos (fig. 75). **Penicillium camemberti**, utilizado na maturação do queijo Camembert e **Penicillium roqueforti** (fig. 77), que é usada na maturação de queijos azuis, sendo o Roquefort (fig. 76) um exemplo.



Figura 75 - Laranjas atacadas por *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*.



Figura 76 - Queijo Roquefort.

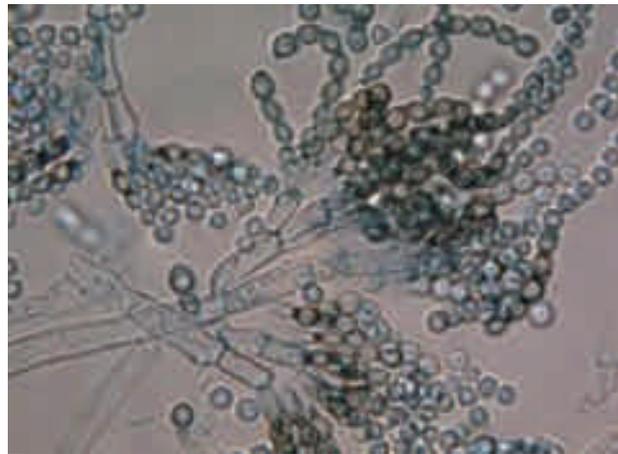


Figura 77 - *Penicillium roqueforti*.

- **Rhizopus** - têm micélio cenocítico e rizóides para fixação ao substrato e a sua reprodução é assexuada. São agentes deterioradores comuns em alimentos de origem vegetal, com produção de enzimas pectinolíticas. Por serem termorresistentes, estas enzimas não são eliminadas durante o processamento térmico dos vegetais, o que pode causar a podridão mole pós-processamento. O **Rhizopus stolonifer** (fig. 78) é um bolor muito comum no pão, chamado de



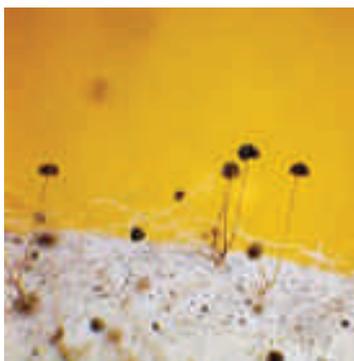


Figura 78 - *Rhizopus stolonifer*.

“bolor do pão” (fig. 79) e intervém na alteração de alguns frutos, vegetais e outros alimentos.

Produzem grande quantidade de ácido fumárico a partir de açúcares fermentáveis. Algumas espécies são utilizadas na preparação de alimentos orientais fermentados.

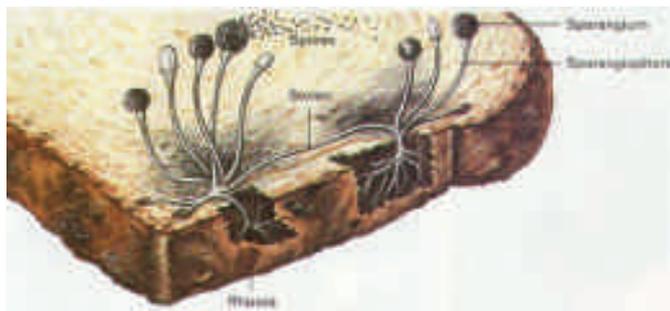


Figura 79 - Esquema do desenvolvimento do *Rhizopus stolonifer*.

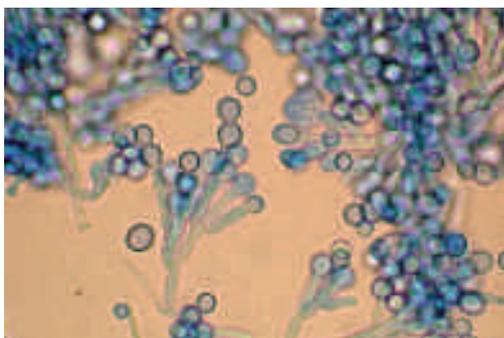


Figura 80 - *Scopulariopsis brevicaulis*.

- **Scopulariopsis** - Bolors proteolíticos que podem causar a deterioração de laticínios (queijo Camembert em especial) e carnes. A espécie mais comum é **Scopulariopsis brevicaulis** (fig. 80).

- **Sporotrichum** - algumas espécies (**Sporotrichum carnis** (fig. 81), por exemplo) multiplicam-se bem em baixas temperaturas (-5°C a -8°C), podendo desenvolver-se na superfície de carnes (fig. 82) mantidas em câmaras frigoríficas.

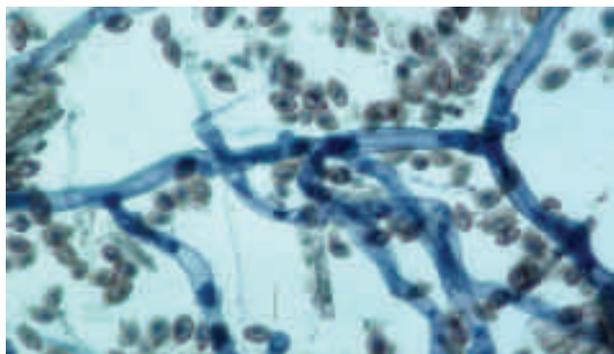


Figura 81 - *Sporotrichum carnis*.

Figura 82 - Carne contaminada com *Sporotrichum carnis*.



- ***Thanmnidium*** - possuem micélio cenocítico, são encontrados em carnes, no solo e em excrementos de animais. Crescem em carnes refrigeradas, com destaque para ***Thanmnidium elegans***.
- Outros géneros como ***Trichoderma*, *Trichotecium*, *Cephalosporium* e *Manascus*** são produtores de micélios de várias cores, e ***Basipetospora*, *Chrysosporium*, *Eremascus*, *Polipaecilum*, *Wallemia* e *Xeromyces***, são xerofílicos.

As leveduras que podemos encontrar nos alimentos, tal como nos bolores, podem ser benéficas ou prejudiciais. Exemplos de utilização benéfica de leveduras são as fermentações produzidas por leveduras na produção de pão, cerveja, vinhos, vinagre e de alguns queijos. As alterações prejudiciais devido à atuação de leveduras podem verificar-se em sumos de frutas, xaropes, mel, carnes, vinho, cerveja e noutros alimentos. A maioria das leveduras com importância para a indústria alimentar desenvolve-se melhor em ambientes com elevado teor de humidade disponível, mais alto do que o requerido pelos bolores, embora mais baixo do que o necessário para as bactérias. O valor favorável de a_w situa-se entre os 0,88 e 0,94. Embora algumas leveduras cresçam em meios em que a_w tem valores entre 0,62 e 0,65, como os xaropes. Em função das outras propriedades do meio, como pH, temperatura, quantidade de oxigénio disponível e presença ou ausência de inibidores, estes valores de a_w podem ser alterados.

O intervalo de temperaturas de crescimento da maioria das leveduras é semelhante ao dos bolores, entre 25 a 30°C e a temperatura máxima pode ir até aos 47°C, contudo verificam-se exceções, sendo conhecidas temperaturas inferiores a 0°C.

O pH ideal de crescimento é ligeiramente ácido (4,0 a 4,5) e em geral são aeróbias, embora as do tipo fermentativo possam crescer lentamente na ausência de oxigénio.

A maior parte das leveduras utilizam os açúcares como fonte de energia, embora as leveduras oxidativas possam utilizar os ácidos orgânicos e o álcool. Como nutrientes, podem utilizar desde compostos simples, como amoníaco e ureia, até polipeptídeos e aminoácidos.

As leveduras podem sofrer mutações e deste modo adaptar-se a novas condições. Exemplo destas mutações são o grande número de variedades que existem dentro da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, adaptadas a diversas utilizações como na elaboração de pão, cerveja, vinho, álcool, etc. Grande parte das leveduras utilizadas na indústria



alimentar são do género *Saccharomyces*, no entanto existem outros géneros com efeitos benéficos ou prejudiciais, sendo importante a sua referência.

Algumas das características das leveduras são:

- Leveduras são fungos unicelulares.
- Podem apresentar forma esférica, ovoide, cilíndrica ou triangular.
- Algumas leveduras são bastante alongadas formando filamentos semelhantes às hifas dos bolores.
- Leveduras com pseudomicélio ou micélio verdadeiro constituem a fase de transição entre as leveduras unicelulares e os fungos filamentosos.
- Requerem menos humidade que a maioria das bactérias e mais que a maioria dos bolores.
- As leveduras podem ser aeróbias e anaeróbias.
- Todas as leveduras podem reproduzir-se assexuadamente por gemulação/brotamento ou fissão celular.
- Quanto à reprodução, as leveduras de interesse em alimentos, podem ser divididas em:
 - Leveduras verdadeiras: há formação de ascos contendo esporos sexuais (ascosporos)
 - Leveduras falsas: não produzem ascosporos ou qualquer outro tipo de esporo sexuado.

Principais Géneros de Leveduras de interesse na Indústria Alimentar

- ***Brettanomyces*** - a espécie mais vulgar é a ***Brettanomyces bruxellensis*** (fig. 83) que produz grandes quantidades de ácido, sendo utilizada na fermentação da cerveja belga do tipo “lambic” e das cervejas inglesas. Também se encontra em vinhos franceses. No entanto, se por um lado pode ser benéfica por outro lado pode ser prejudicial e danificar os vinhos.

Figura 83 - *Brettanomyces bruxellensis*.



- **Candida** - não produzem esporos assexuados. Formam pseudomicélio, mas algumas formam micélio verdadeiro. São muito comuns em carne fresca bovina e de aves. Os membros desta espécie são conhecidos pela sua capacidade de alterar os alimentos com elevada acidez e concentração de sal. Algumas espécies estão envolvidas na deterioração de frutas secas, vegetais, laticínios, bebidas alcoólicas e refrigerantes.



Figura 84 - *Candida-krusei-pseudohyphae*.



Figura 85 - *Candida albicans*.

A espécie **Candida krusei** (fig. 84) tem ação benéfica e é utilizada na indústria de laticínios para manter a atividade e aumentar a longevidade das bactérias lácticas.

Algumas espécies são patogénicas para o homem (**Candida albicans**) (fig. 85), mas não estão relacionadas com alimentos.

- **Cryptococcus** (fig. 86) - reproduzem-se assexuadamente por gemulação multi-lateral. Não são fermentativos. São encontrados no solo, em plantas, morangos, pescados marinhos, camarão, carne bovina crua, refrigerantes, vinhos e grãos de cereais.

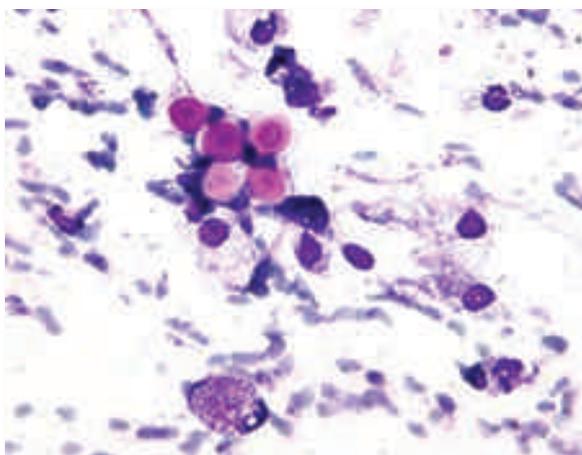


Figura 86 - *Cryptococcus*.



- **Debaromyces** (fig. 87) - São esféricas e reproduzem-se por gemulação multilateral. Têm pouca atividade fermentativa e elevada tolerância ao sal (18 a 20%) e pertencem ao grupo de leveduras formadoras de películas na superfície de alimentos salgados ou mantidos em salmoura.

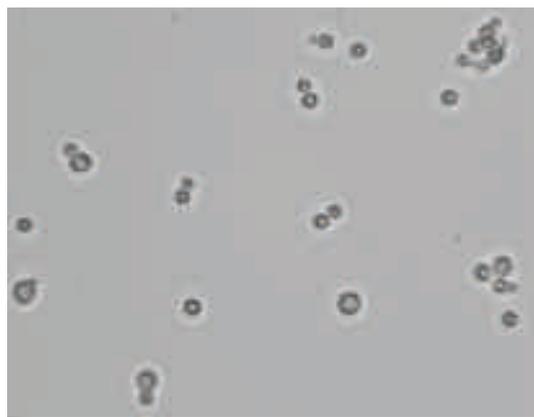


Figura 87 - *Debaromyces*.



- **Hanseniaspora** (fig. 88) - são leveduras apiculadas, em forma de limão, com intensa atividade fermentativa. Podem ser encontradas numa grande variedade de alimentos: figos, tomates, morangos, frutas cítricas e vinhos.

Figura 88 - *Hanseniaspora*.

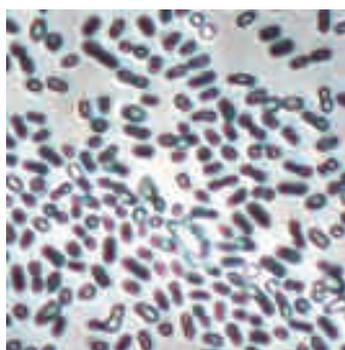
- **Issatchenkia** (fig. 89) - produzem pseudomicélio, multiplicando-se por gemulação multilateral. Formam películas quando em meio líquido, podendo ser encontradas em grande variedade de alimentos como frutas, refrigerantes, vinhos e pescados.



Figura 89 - *Issatchenkia orientalis*.

Issatchenkia orientalis, anteriormente

denominada ***Candida krusei***, é utilizada como cultura *starter* de laticínios. E está presente no Kefir.



- **Kloeckera** - a ***Kloeckera apiculata*** (fig. 90) é um contaminante vulgar das frutas e flores e também do solo.

Figura 90 - *Kloeckera apiculata*.



- ***Kluyveromyces*** (fig. 91) - Multiplicam-se por gemulação multilateral, as células podem ser esféricas, elipsoidais, cilíndricas ou alongadas. Têm atividade fermentativa muito intensa, podendo multiplicar-se desde 5°C até 46°C, causando deterioração em laticínios, carnes e frutas. Algumas espécies são osmofílicas.

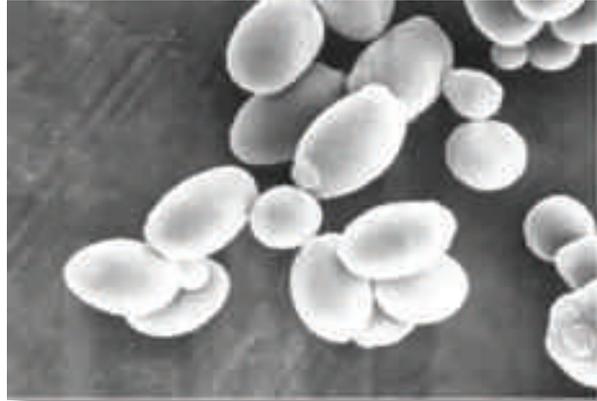


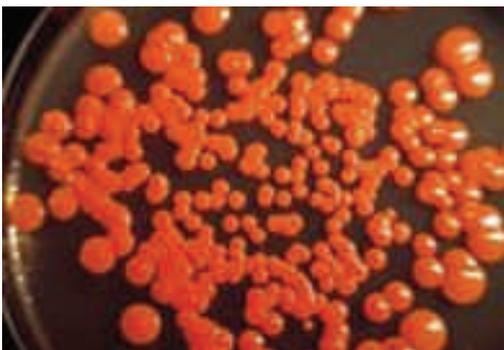
Figura 91 - *Kluyveromyces*.

- ***Pichia*** - são leveduras ovais a cilíndricas, com reprodução assexuada por gemulação multilateral e formadoras de pseudomicélio. Formam películas na superfície de líquidos, como salmouras. A ***Pichia membranifaciens*** (fig. 92), por exemplo, cresce na superfície de cervejas e de vinhos. São importantes agentes deterioradores de cerveja, vinho, laticínios e frutas. Algumas espécies são osmofílicas, multiplicando-se em alimentos com alto teor de açúcar (sumos concentrados, caldo de carne, etc.).



Figura 92 - *Pichia membranifaciens*.

- ***Rhodotorula*** (fig. 93) - podem ser esferoidais, ovóides ou alongadas e



reproduzir-se por gemulação multilateral. Este género contém espécies psicrotróficas. São produtoras de pigmentos carotenóides de coloração amarela ou vermelha, na forma de

Figura 93 - Colónias de *Rhodotorula glutinis*.



manchas na superfície de alimentos. Têm sido associadas a alteração de cor em carnes, laticínios e produtos fermentados. São comuns em bebidas não alcoólicas (sumos de laranja e maçã, etc.).

- ***Saccharomyces*** - grupo bastante heterogêneo, com leveduras que se multiplicam por gemulação multilateral ou através da formação de pseudomicélio. Todas as espécies têm intensa atividade fermentativa. As espécies mais importantes são ***Saccharomyces cerevisiae*** (fig. 94), utilizada para as mais variadas finalidades: produção de pães, bebidas (cervejas, vinhos, etc.), álcool, glicerol, invertase e outras aplicações em processo tecnológicos. Por outro lado estão frequentemente envolvidas em alterações indesejáveis em frutas, laticínios (leite, manteiga, etc.), maionese, mel, vinagre e produtos fermentados. As leveduras de superfície são fermentadoras muito ativas, crescendo rapidamente à temperatura de 20°C. A formação de agregados celulares e a rápida produção de dióxido de carbono provocam o deslocamento das células de leveduras na superfície da massa líquida, sendo esta a razão pela qual são conhecidas como leveduras de superfície. As leveduras do fundo dos tanques de fermentação não formam agregados celulares, crescem mais lentamente e têm maior atividade fermentativa a temperaturas mais baixas (10 - 15°C). Estes fatos permitem a sua sedimentação no fundo, sendo por isso denominadas leveduras de fundo.



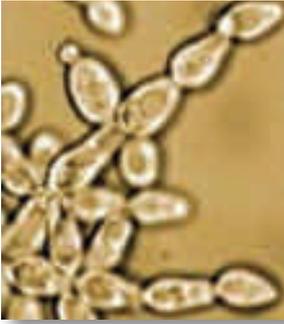
Figura 94 - *Saccharomyces cerevisiae*.



A espécie ***Saccharomyces ellipsoideus*** (fig. 95) produz elevadas concentrações de álcool, sendo utilizada não só para a produção industrial de álcool mas, também na elaboração de vinhos e licores de destilação.

Figura 95 - *Saccharomyces ellipsoideus*.





A *Saccharomyces uvarum* (fig. 96) é uma levedura de fundo utilizada no fabrico de cerveja.

Figura 96 - *Saccharomyces uvarum*.

- *Schizosaccharomyces* - células esféricas ou cilíndricas, reprodução assexuada, feita por fissão celular. Não apresentam gemulação. Têm intensa atividade fermentativa, requerendo vitaminas para a sua multiplicação. Formam um micélio verdadeiro rudimentar e ascos contendo de 4 a 8 ascósporos. Leveduras contaminantes de frutas tropicais, melaço, mel e solo. Algumas espécies são xerotolerantes, crescendo em mel, rebuçados e caldo de cana. *Schizosaccharomyces pombe* (fig. 97) é uma espécie corrente.



Figura 97 - *Schizosaccharomyces pombe*.

- *Torulopsis* - estas leveduras, fermentativas, provocam problemas nas fábricas de cerveja e produzem alterações em diversos alimentos. Outras espécies são capazes de alterar o leite condensado açucarado, os concentrados de sumos e os alimentos ácidos. A única espécie importante para alimentos é *Torulopsis delbrueckii* (fig. 98), associada à deterioração de frutas, refrigerantes, cervejas,



pães e queijos. Por ser osmolítica, pode ser encontrada em alimentos com elevado teor de açúcar, como sumos concentrados, mel e açúcar.

Figura 98 - *Torulopsis delbrueckii*.



- **Trichosporon** - produzem micélio verdadeiro e não têm capacidade de fermentar açúcares. Podem ser encontradas em camarões frescos, carne moída, carne de aves, sumos de frutas, grãos de cereais e vinhos. **Trichosporon pullulans** (fig. 99) é a espécie predominante.



Figura 99 - *Trichosporon pullulans*.

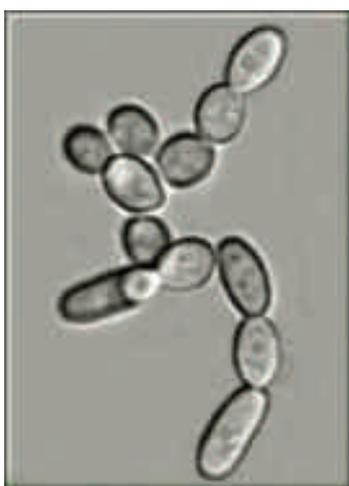


Figura 100 - *Zygosaccharomyces rouxii*.

- **Zygosaccharomyces**: Intensa capacidade de fermentar açúcares. A espécie **Zygosaccharomyces rouxii** (fig. 100) é osmófila, isto é, tolera a_w mínima de 0,7 podendo ser encontrada em xaropes, doces, frutas secas e massapão. A **Zygosaccharomyces bailii** é capaz de se multiplicar em pH 1,8 mas não se multiplica em a_w inferior a 0,85. Esta espécie é importante na deterioração de maioneses, molhos de saladas, frutas e sumos de frutas e refrigerantes. São muito resistentes aos conservantes químicos utilizados nos alimentos (sorbatos e benzoatos, especialmente).

As leveduras formadoras de películas (fig. 101) dos gêneros *Pichia*, *Candida* e *Trichosporon*, crescem na superfície dos alimentos ácidos, oxidando os ácidos orgânicos e permitindo que outros microrganismos menos tolerantes da acidez atuem, continuando a alteração dos alimentos. As leveduras do gênero *Pichia* toleram elevadas concentrações de álcool, sendo capazes de oxidá-lo nas bebidas alcoólicas. Nos vinhos de Jerez (vinho adocicado), são crescidas espécies do gênero *Pichia*, no intuito de lhes comunicar sabores característicos.

As leveduras halotolerantes crescem nas salmouras utilizadas na conservação de alimentos e ainda nos molhos de soja, miso e tamari.

Figura 101 - Película de leveduras formada na superfície de um líquido.



3.3. Efeitos das bactérias na Indústria Agroalimentar

O crescimento de bactérias, tanto no interior dos alimentos como na superfície dos mesmos, provoca-lhes um aspeto desagradável, podendo mesmo, nalguns casos, torná-los prejudiciais. Com exemplos de danos provocados por bactérias, podemos referir a modificação da cor da superfície de alguns alimentos por bactérias produtoras de pigmentos, a formação de película na superfície dos líquidos, o aumento da viscosidade superficial de certos alimentos, ou o aparecimento de turbidez ou de sedimentos indesejáveis em alimentos líquidos.

Estes microrganismos unicelulares são caracterizados por um ciclo de vida dividido em quatro fases bem distintas, esquematizadas no gráfico (fig. 102) seguinte:

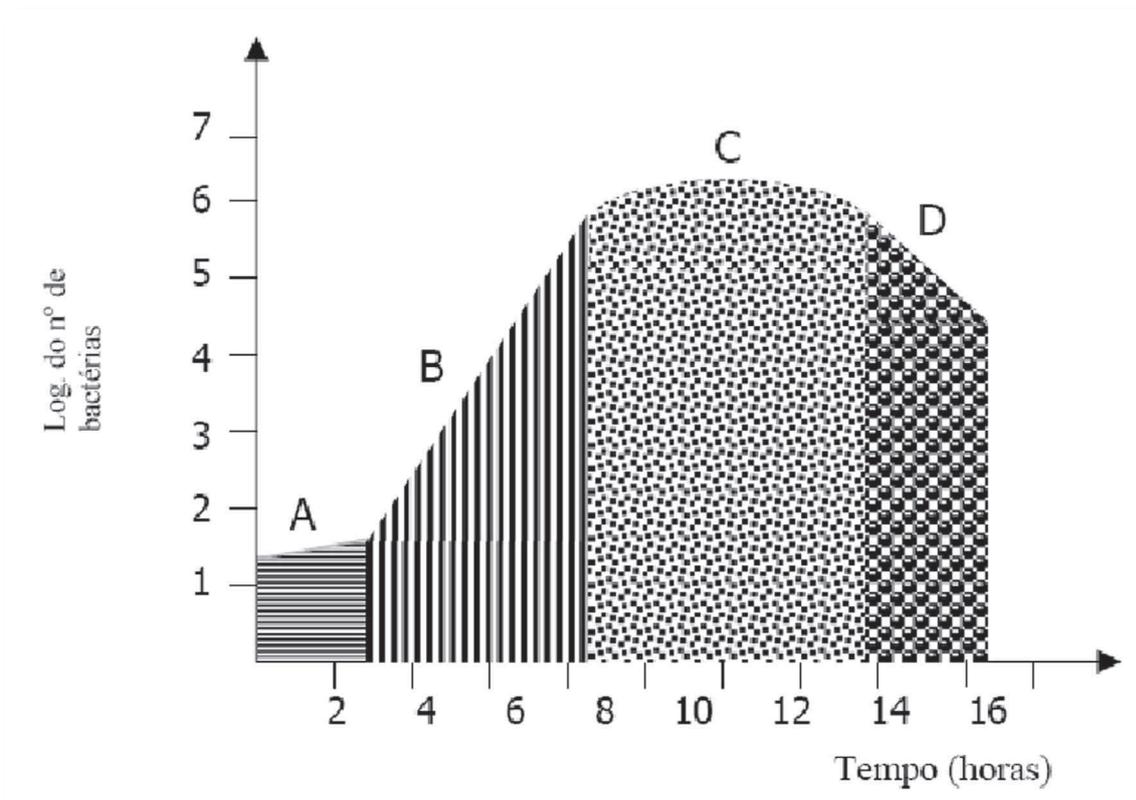


Figura 102 - Gráfico representativo do crescimento bacteriano em função do seu tempo de vida.

A - Fase de latência - fase em que o crescimento é mínimo. É o período de contato e adaptação da bactéria ao novo meio de crescimento.

B - Fase de crescimento rápido - fase em que se dá a multiplicação exponencial das bactérias, após adaptação ao meio.



C - Fase estacionária - período em que começa a dar-se a exaustão dos nutrientes, as bactérias param de se multiplicar, por exemplo o número de indivíduos mantém-se constante, de modo a tirar o maior rendimento possível da escassez de alimentos.

D - Fase de declínio - também conhecida por fase de morte, pois é o período em que as bactérias deixam de ter condições de subsistir, começando a morrer, até ao total desaparecimento.

Em microbiologia alimentar, são da maior importância as espécies produtoras de esporos dos géneros *Bacillus* e *Clostridium*, pois estes esporos podem permanecer em latência durante vários anos, dando rapidamente origem a novas colónias de bactérias assim que encontrem um meio adequado, resultando, geralmente, em contaminações alimentares. As bactérias importantes para a indústria alimentar podem ser agrupados em sete categorias:

1. **Bactérias Gram Negativas, Aeróbias e Microaeróbias;**
2. **Bactérias Gram Negativas Aeróbias Estritas;**
3. **Bactérias Gram Negativas Anaeróbia Facultativa;**
4. **Cocos Gram Positivos;**
5. **Bacilos Gram Positivos Produtores de Esporos;**
6. **Bacilos Gram Positivos não Esporulados;**
7. **Outros.**

1 - Bactérias Gram Negativas, Aeróbias e Microaeróbias

Neste grupo apenas o género *Campylobacter* tem importância para os alimentos. São oxidase positivos, têm flagelos polares com movimento saca-rolha. As espécies importantes são *Campylobacter jejuni* (fig. 103), *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*, que são patogénicos causadores de gastroenterites de origem alimentar.



Figura 103 - *Campylobacter jejuni*.



2 - Bactérias Gram Negativas Aeróbias Estritas

Incluem-se neste grupo as seguintes famílias e gêneros:

- ***Pseudomonadaceae***, com os gêneros: ***Pseudomonas*** e ***Xanthomonas***;
- ***Halobacteriaceae***, com os gêneros: ***Halobacterium*** e ***Halococcus***;
- ***Acetobacteriaceae***, com os gêneros: ***Acetobacter*** e ***Gluconobacter***
- ***Neisseriaceae***, com os gêneros: ***Acinetobacter***, ***Alcaligenes***, ***Brucella***, ***Flavobacterium***, ***Moraxella***, ***Psychrobacter*** e ***Shewanella***.

Pseudomonas - bacilos retos ou curvos, móveis com flagelação polar. De catalase e oxidase positivos. Estas bactérias encontram-se amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em produtos de origem animal e vegetal. A sua presença nos alimentos é importante devido a sua intensa atividade metabólica, utilizando uma grande variedade de compostos orgânicos e produzindo pigmentos hidrossolúveis, enzimas proteolíticas e lipolíticas. As ***Pseudomonas*** (fig. 104) são incapazes de utilizar hidratos de carbono como nutrientes, mas têm capacidade para utilizar outros compostos carbonados. Produzem diversas substâncias que provocam sabores desagradáveis nos alimentos. Como fontes de azoto utilizam compostos azotados simples. São capazes de sintetizar as suas próprias vitaminas.



Figura 104 - *Pseudomonas*.

As ***Pseudomonas*** possuem a capacidade de crescer a baixas temperaturas. *Pseudomonas* psicrótróficas são encontradas em alimentos refrigerados e congelados. Devido à sua baixa resistência térmica só são encontradas em alimentos processados que sofreram contaminação pós processamento.

Uma das espécies, ***Pseudomonas fluorescens*** (fig.s 105 e 106), produz um pigmento, a pioverdina, que faz com que os alimentos adquiram uma fluorescência verde. Este género caracteriza-se ainda pela sua resistência a alguns desinfetantes e detergentes utilizados na indústria alimentar.





Figura 105 - *Pseudomonas fluorescens*.



Figura 106 - *Pseudomonas fluorescens*, ampliação.

Xanthomonas - são bacilos retos, móveis com flagelação polar e catalase positivos. Muitas espécies são patogênicas para as plantas como a *Xanthomona campestris* (fig. 107) responsável pelo cancro cítrico (fig. 108). Podem causar vários tipos de deterioração em produtos de origem vegetal.



Figura 107 -
Xanthomona
campestris.

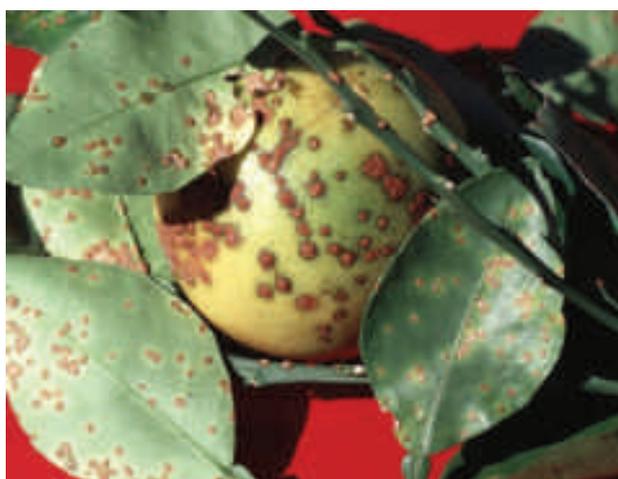


Figura 108 - Laranjeira e laranjas com cancro cítrico, devido a contaminação pela bactéria *Xanthomona campestris*.

Halobacteriaceae - são organismos halófilos extremos, necessitando de 15% de sal para a sua multiplicação. Esta elevada concentração de sal é necessária para a atividade de enzimas, estabilidade das membranas e ribossomas, e para a síntese protéica. Crescem em alimentos salgados como peixe e carne produzindo viscosidade e odor extremamente desagradáveis. Os gêneros mais importantes são *Halobacterium* (fig. 109) e *Halococcus*.



Halobacterium, de facto não são bactérias mas sim *Archaea*, pois tanto bioquímica como geneticamente são completamente diferentes das bactérias. No entanto, a estes organismos só muito recentemente foi reconhecida uma identidade correspondente à sua especificidade. São organismos halófilos obrigatórios, pois apenas crescem em ambientes com elevadas concentrações salinas. Estes microrganismos têm a particularidade de possuir um pigmento (bacteriorodopsina) que lhes dá a característica cor vermelha e que não é mais do que um sistema fotossintético simples que lhes fornece energia química.



Figura 109 - *Halobacterium*.



Figura 110 - *Acetobacter acetii*.

Acetobacter (fig. 110) - bactérias em forma de bacilo capazes de oxidar o etanol a ácido acético e acetato e lactato a CO_2 e H_2O . A coloração Gram pode ser variável em função da idade da cultura. Podem ser móveis (com flagelos e peritríqueos) ou imóveis. São encontrados em frutas e vegetais e são responsáveis pela deterioração de sumos de

frutas e bebidas alcoólicas (vinhos e cervejas).

Gluconobacter - bactérias com capacidade de oxidar o etanol a ácido acético. A espécie mais importante é **Gluconobacter oxydans** (fig. 111) encontrado em vegetais, frutas, fermentos, cerveja, vinho, cidra e vinagre, causando a sua deterioração pois provoca o aparecimento de viscosidade, principalmente na cerveja. São de forma elipsoidal ou de bacilo. As culturas jovens são Gram negativas, mas ficam Gram variáveis à medida que a cultura envelhece. São móveis (com flagelos peritríqueos) ou imóveis. As células podem ficar isoladas, agrupadas, em pares ou cadeia. São aeróbios estritos.

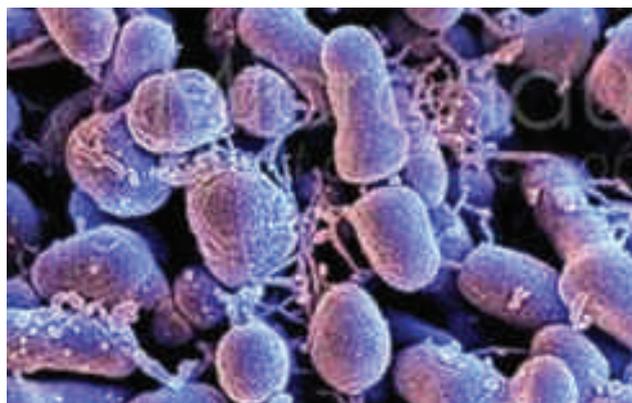


Figura 111 - *Gluconobacter oxydans*.





Acinetobacter (fig. 112) - são bacilos curtos ou cocobacilos, predominantemente aos pares ou em cadeias curtas. São aeróbios estritos e mesófilos, importantes agentes de deterioração de alimentos, tanto crus como processados, incluindo carnes e carcaças de aves.

Figura 112 - Acinetobacter.

Alcaligenes (fig. 113) - têm coloração Gram variável, podendo apresentar-se na forma de cocos, cocobacilos ou bacilos. São móveis, aeróbios estritos e oxidase positivos. Não fermentam açúcares, mas produzem reações alcalinas. Como o seu nome indica, estas bactérias provocam uma alcalinização do meio em que crescem. Estes microrganismos provêm do estrume, do solo, da água e do pó. Encontram-se largamente distribuídos na natureza e têm sido causadores de deterioração de alimentos protéicos, como por exemplo leite cru, carnes, ovos e laticínios.



Figura 113 - Alcaligenes.



Alteromonas (fig. 114) - são bactérias aeróbias, halófilas, móveis e comuns em ambientes marinhos. Podem causar deterioração de pescados.

Figura 114 - Alteromonas.

Brucella - são cocobacilos ou bacilos curtos, imóveis, com algumas espécies patogénicas: **Brucella abortus**, patogénico para o gado bovino, e **Brucella suis** patogénico para suínos. São espécies que podem causar brucelose no homem. As fontes de infeção são o leite cru e laticínios, carnes não cozidas ou derivados de carne e portadores humanos



porque têm baixa resistência térmica e são facilmente eliminados pela pasteurização.



Figura 115 - *Brucella abortus*.

Flavobacterium (fig. 116) - espécies bacilares imóveis, caracterizam-se por produzir pigmentos carotenóides, cujas cores vão do amarelo ao laranja. A produção de pigmentos depende da temperatura e substrato. Podem provocar colorações anormais na superfície das carnes e pensa-se que intervenham na alteração dos mariscos, ovos e manteiga. Multiplicam-se melhor abaixo de 30°C e algumas espécies são psicrotrófilas, sendo encontradas, em crescimento, na superfície de legumes conservados por congelação, uma vez descongelados. Podem ser isoladas da água, solo, animais, humanos e diversos alimentos vegetais frescos e congelados, pescado, carne e derivados e aves.

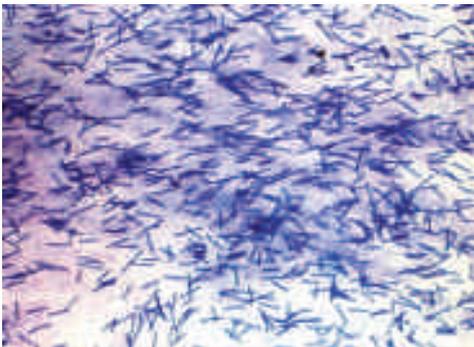


Figura 116 - *Flavobacterium*.

Moraxella (fig. 117) - são bacilos Gram negativos curtos, muitas vezes classificados como **Acinetobacter**, diferindo destes apenas por serem sensíveis a penicilina e oxidase positivos. O seu metabolismo é oxidativo, não formam ácido a partir de glicose.

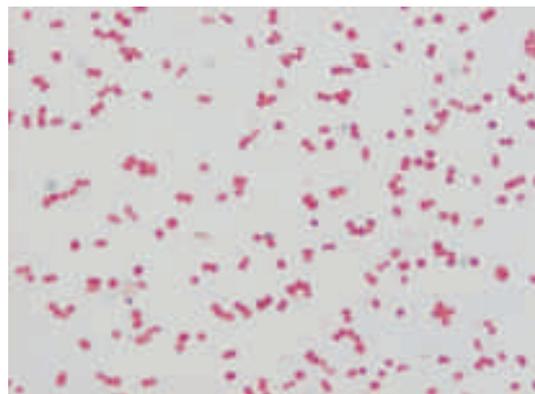


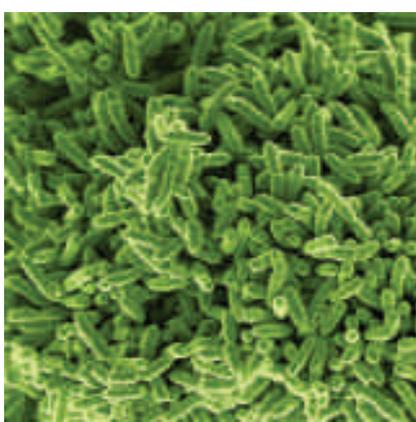
Figura 117 - *Moraxella*.



Psychrobacter - género recentemente criado contém bacilos Gram negativos imóveis, anteriormente pertencentes aos géneros **Moraxella** e **Acinetobacter**. A única espécie é **Psychrobacter immobilis** (fig. 118), comum em carnes, aves e peixes e também no ambiente aquático.



Figura 118 - *Psychrobacter immobilis*.



Shewanella - a espécie importante é **Shewanella putrefaciens** (fig. 119), anteriormente denominada **Pseudomonas putrefaciens** ou **Alteromonas putrefaciens** associada ao ambiente aquático e marinho.

Figura 119 - *Shewanella putrefaciens*.

3 - Bactérias Gram Negativas Anaeróbias Facultativas

Neste grupo estão incluídas as famílias **Enterobacteriaceae** e **Vibrionaceae**. Estas duas famílias contêm muitos géneros, mas somente os importantes para os alimentos serão apresentados a seguir.

Citrobacter - são bacilos móveis, com capacidade de utilizar citrato como única fonte de carbono. Pertencem ao grupo dos Coliformes e são bactérias intestinais, podem ser encontrados em muitos alimentos. Não há provas de ser causador de doença de origem alimentar, mas podem causar deterioração nos alimentos. **Citrobacter freundii** (fig. 120) é a espécie mais comum em alimentos.



Figura 120 - *Citrobacter freundii*.



Edwardsiella - são bacilos móveis com flagelos peritríqueos. Algumas espécies podem ser patogênicas para o homem, mas sua veiculação em alimentos ainda não foi suficientemente demonstrada.

Figura 121 - *Edwardsiella*.



Enterobacter (fig. 122) - são bacilos imóveis, fazem parte da microbiota intestinal do homem e pertencem ao grupo dos Coliformes. Podem causar deterioração de alimentos, sendo ainda questionável sua importância como agente causador de doença de origem alimentar.

Figura 122 - *Enterobacter*.

Erwinia - microrganismos patogênicos para as plantas, danificando as frutas e vegetais, pois são importantes agentes causadores de doenças em plantas. São bacilos pequenos, móveis (com flagelos peritríquios). São oxidase negativo e catalase positivo. A **Erwinia carotovora** (fig. 123) é responsável por um tipo vulgar de podridão de hortaliças. A **Erwinia carotovora ssp. atroseptica** provoca a podridão negra dos tubérculos de batata (fig. 124).

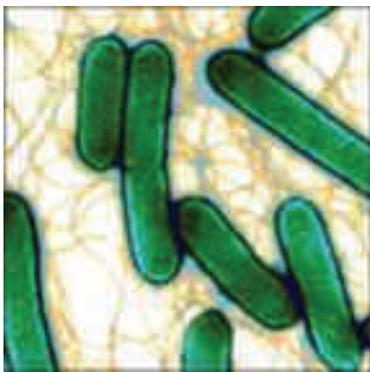


Figura 123 - *Erwinia carotovora*.

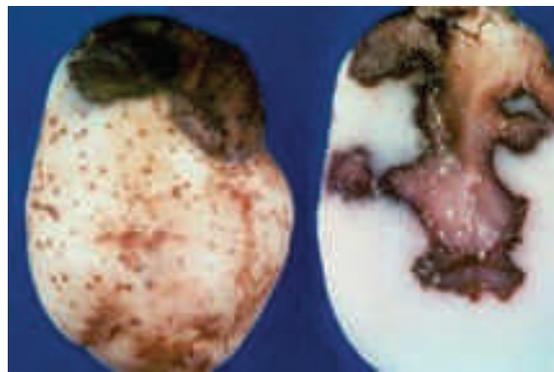


Figura 124 - Batata com podridão negra contaminada por *Erwinia carotovora*.



Escherichia - bactéria encontrada nas fezes, cresce no intestino dos animais de sangue quente e é um dos microrganismos mais difundidos na natureza. A principal espécie



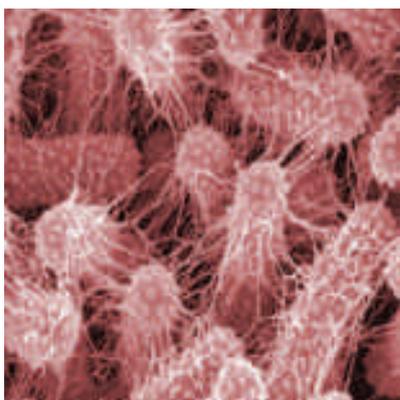
é **Escherichia coli** (fig. 125) pertence ao grupo dos Coliformes fecais, que são indicadores de contaminação fecal em alimentos. **E. coli** pode causar reações indesejáveis nos alimentos, além de várias linhagens serem patogênicas para o homem e animais.

Figura 125 - *Escherichia coli*.

Hafnia (fig. 126) - são bacilos móveis, importantes na deterioração de carnes refrigeradas e vegetais. São importantes causadores de doenças em plantas.



Figura 126 - *Hafnia*.



Klebsiella - são frequentemente encontradas nas vias respiratórias e trato intestinal humanos. São bacilos imóveis, produtores de cápsula. Fazem parte do grupo do Coliformes, sendo importantes por desenvolver reações indesejáveis nos alimentos. **Klebsiella pneumoniae** (fig. 127) é um exemplo de uma espécie patogênica para o homem.

Figura 127 - *Klebsiella pneumoniae*.

Pantoea - gênero novo contendo bacilos retos não encapsulado e móveis (com flagelos peritríquios). São oxidase negativos e algumas espécies produzem pigmentos amarelos. Encontram-se em plantas, sementes, solo, águas e espécimes humanos. Este gênero contém duas espécies apenas, **Pantoea agglomerans** (fig. 128 e 129) e **Pantoea dispersa**.

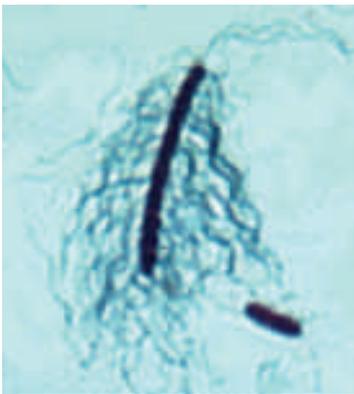




Figura 128 - *Pantoea agglomerans*.



Figura 129 - Ananás descascado contaminado com *Pantoea agglomerans*.



Proteus (fig. 130) - são bacilos móveis, com flagelos peritríquios. São patogénicos em potencial. Provocam alterações na carne, no peixe, nos mariscos e nos ovos e podem provocar intoxicações alimentares. São importantes na deterioração de alimentos.

Figura 130 - *Proteus*.

Salmonella (fig. 131) - são bacilos não esporulados sendo a sua maioria móveis. O seu principal reservatório é o trato gastrointestinal do homem e de animais, principalmente aves e suínos. Este género abriga espécies causadoras de febre tifóide (***Salmonella tify***), das febres entéricas (***Salmonella paratyphi*** A, B e C) e das enterocolites por ***Salmonella*** (salmoneloses). As espécies destes patogénicos entéricos podem crescer nos alimentos e provocar infeções alimentares.



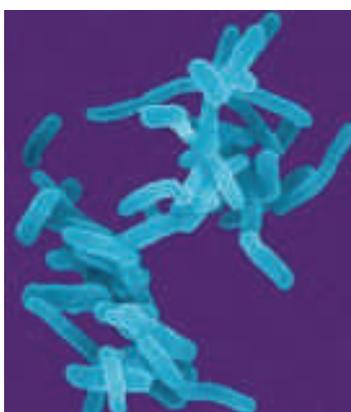
Figura 131 - *Salmonella*.



Serratia (fig. 132) - são bacilos imóveis. As espécies importantes nos alimentos são **Serratia macencens**, produtora de pigmentos vermelhos de natureza carotenóide e **Serratia liquefaciens**, que causa deterioração de vegetais e carnes refrigeradas. São Gram negativas e anaeróbias facultativas. A espécie mais comum é **Serratia macencens**.



Figura 132 - *Serratia macencens*.



Shigella (fig. 133) - são bacilos não esporulados, imóveis. Encontram-se no trato gastrointestinal do homem e de outros primatas. Microrganismo patogénico causador da shigelose (disenteria bacilar), que pode ser de origem alimentar.

Figura 133 - *Shigella*.

Yersinia (fig. 134) - bactérias ovóides ou em forma de bacilos. Encontram-se no solo. Uma espécie importante é a **Yersinia enterocolitica**, causadora de várias doenças no homem como gastroenterite, lifandenite mesentérica, ileíte terminal e pseudoapendicite, podendo ser transmitida nos alimentos. A espécie **Yersinia pestis** é a causadora da peste no homem. Bactérias deste género foram isoladas em muitos alimentos, principalmente em países de clima frio.

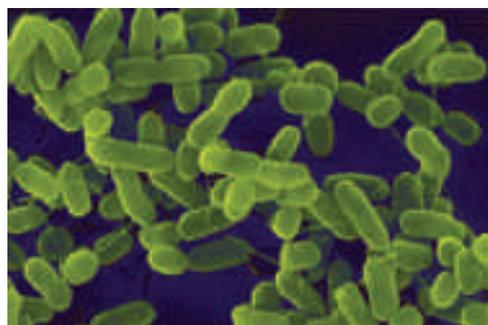


Figura 134 - *Yersinia enterocolitica*.

Aeromonas - são bacilos móveis (com flagelos polares) e oxidase e catalase positivos. Características bioquímicas similares às enterobactérias. São comuns no ambiente aquático, sendo habitantes naturais do intestino de peixes. As **Aeromonas** encontram-



se em muitos alimentos, especialmente em produtos frescos refrigerados. A espécie ***Aeromonas hydrophila*** (fig. 135) é patogênica e pode ser transmitida pelos alimentos.

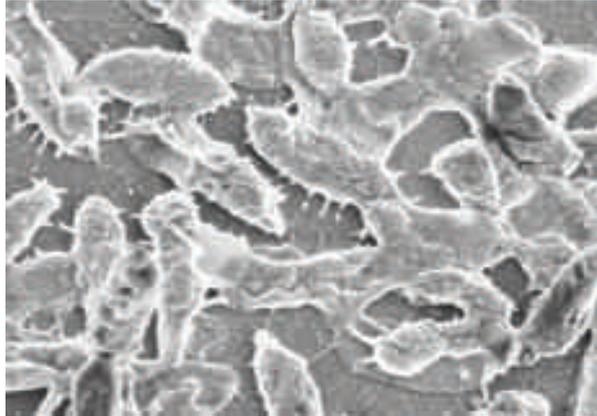


Figura 135 - *Aeromonas hydrophila*.

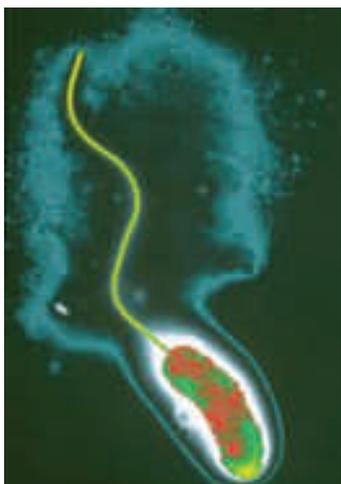
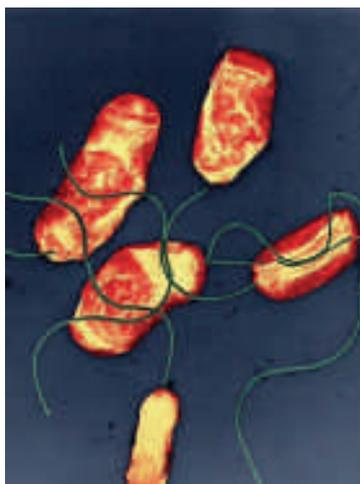
Plesiomonas - anteriormente pertenciam à família ***Enterobacteriaceae***, atualmente são membro da família ***Vibrionaceae***. São bacilos catalase e oxidase positivos. A espécie ***Plesiomonas shigelloides*** (fig. 136) é potencialmente patogênica para o homem, tendo sido isolada principalmente em água, peixe, caranguejos e ostras cruas.



Figura 136 - *Plesiomonas shigelloides*.

Vibrio - pertencem a família ***Vibrionaceae***. São bacilos pequenos, retos ou curvos, móveis e oxidase positivos. Algumas espécies são incapazes de se multiplicar na ausência de NaCl. A espécie ***Vibrio costicola*** é capaz de tolerar até 23% de NaCl, tendo sido isolada de carne curada e salmoura. As espécies ***Vibrio cholerae***, ***Vibrio vulnificus*** e ***Vibrio parahaemolyticus*** são patógenos importantes nos alimentos. O ***Vibrio cholerae*** (fig. 137) é encontrado no trato gastrointestinal de humanos, na água e, ocasionalmente, em alimentos. ***Vibrio vulnificus*** (fig. 138) e ***Vibrio parahaemolyticus*** (fig. 139) são encontrados na água do mar e alimentos marinhos. Podem ser encontrados tanto em água doce como salgada, no solo, e no tubo digestivo do homem e outros animais.



Figura 137 - *Vibrio cholerae*.Figura 138 - *Vibrio*Figura 139 - *Vibrio parahaemolyticus*.

4 - Cocos Gram Positivos

Neste grupo estão incluídas as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas da família ***Micrococcaceae*** (***Micrococcus*** e ***Staphylococcus***) e os cocos pertencentes aos gêneros ***Aerococcus***, ***Enterococcus***, ***Lactococcus***, ***Leuconostoc***, ***Streptococcus***, ***Pediococcus*** e ***Vagococcus***.

Micrococcus - são aeróbios estritos, catalase positivos, ocorrendo isolados ou aos pares, dividindo-se e formando aglomerados. Podem ser encontrados no solo, água, pó, na pele do homem e dos animais. É comum ser encontrado nos alimentos, especialmente leite e derivados, carcaças de animais e produtos cárneos. São importantes agentes deterioradores desses alimentos. As suas propriedades variam muito de espécie para espécie. Algumas são capazes de utilizar sais de amônio e outros compostos azotados simples como única fonte de azoto. Outros têm capacidade para desdobrar proteínas para produção de ácidos. A maioria das espécies é capaz de fermentar açúcares, produzindo ácidos. Uma parte tolera elevadas concentrações de sal (cloreto de sódio - NaCl). Certas espécies, como ***Micrococcus varians*** (fig. 140), resistem ao tratamento de pasteurização do leite. Outras ainda, produzem pigmentos e causam colorações anormais na superfície dos alimentos que contaminam. Finalmente, alguns membros deste gênero são capazes de crescer a temperaturas inferiores a 10°C. Estes microrganismos encontram-se com frequência no pó e na água e também são encontrados nos utensílios de manipulação de alimentos, quando insuficientemente lavados e desinfetados.



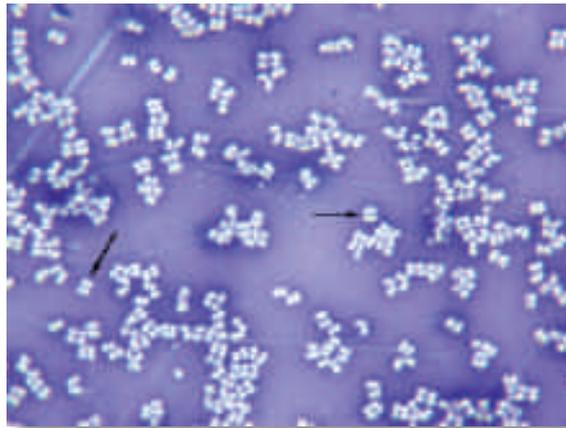


Figura 140 - *Micrococcus varians*, apresentam em grupos de quatro.

Staphylococcus - são anaeróbios facultativos, ocorrendo isolados, aos pares e em aglomerados, crescem muitas vezes em forma de cacho. A maioria multiplica-se em concentrações de 7,5% a 15% de NaCl. São encontrados em muitos alimentos, mas no entanto não competem bem com outros microrganismos presentes. Podem ser produtores de enterotoxinas nos alimentos, causando intoxicação quando consumidos. O ***Staphylococcus aureus*** (fig. 141) é a espécie mais importante e é patogénica, provocando intoxicações alimentares, podem também ser encontrados em lesões na pele e nas vias aéreas superiores do homem, sendo facilmente transferidos para os alimentos. O ***Staphylococcus epidermes*** (fig. 142) é também comum na pele humana, mas normalmente não é patogénico.



Figura 141 - *Staphylococcus aureus*.

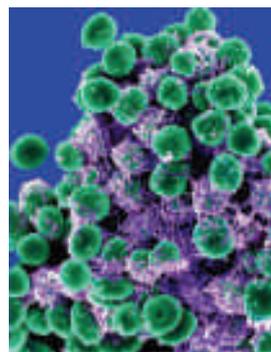


Figura 142 - *Staphylococcus epidermes*.

Aerococcus - ***Aerococcus viridans*** é a única espécie importante, com características muito similares ao ***Pediococcus***.



Enterococcus - trata-se de um gênero novo, criado para acomodar alguns cocos Gram positivos anteriormente pertencentes ao grupo dos **Streptococcus**, chamados genericamente de enterococos. As duas espécies importantes são: **Enterococcus faecium** (fig. 143) e **Enterococcus faecalis** (fig. 144). A sua importância nos alimentos deve-se à característica de serem de origem fecal, podendo ser utilizados como microrganismos indicadores de más condições de higiene e desinfecção. Não são patogênicos.

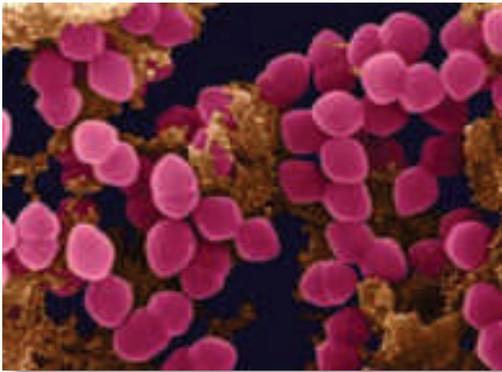


Figura 143 - *Enterococcus faecium*.

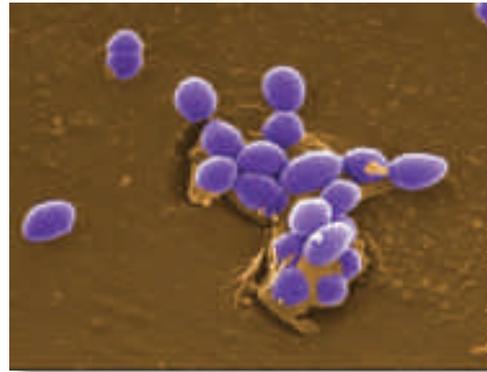


Figura 144 - *Enterococcus faecalis*.

Lactococcus - trata-se também de um gênero novo, contendo cocos Gram positivos anteriormente classificados como **Streptococcus**, e bacilos Gram positivos anteriormente classificados como **Lactobacillus**. São catalase negativa e produzem ácido lático a partir de glicose. O gênero é formado por quatro espécies e três subespécies: **Lactococcus lactis subsp. lactis**, **Lactococcus lactis subsp. cremoris**, **Lactococcus lactis subsp. hordniae**, **Lactococcus garviae**, **Lactococcus plantarum** e **Lactococcus raffinolactis**. Não são patogênicos e têm importância na fabricação de alimentos.



Figura 145 - *Lactococcus lactis*.



Leuconostoc - são células esféricas e lenticulares, ocorrendo aos pares e em cadeias. São bastante exigentes na sua multiplicação, requerendo vitaminas, aminoácidos e açúcares fermentáveis. Não são patogênicas e a sua importância advém da fermentação e rápida deterioração do alimento. Este género inclui os estreptococos lácticos heterofermentativos que fermentam o açúcar, produzindo ácido láctico e grandes quantidades de ácido acético, etanol e dióxido de carbono. **Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum** e **Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris** são utilizados na produção de nata, manteiga e queijo devido à sua capacidade de fermentar o ácido cítrico, presente no leite, produzindo uma substância de sabor agradável (o diacetilo). Outras importantes propriedades destas espécies são:

- Tolerância a elevadas concentrações de sal, permitindo a **Leuconostoc mesenteroides** (fig. 146), por exemplo, iniciar a primeira fase da fermentação láctica em alimentos ricos em sal;
- Maior eficácia na fermentação de produtos vegetais que a generalidade das outras bactérias;
- Capacidade de crescer em alimentos com elevada concentração de açúcar.

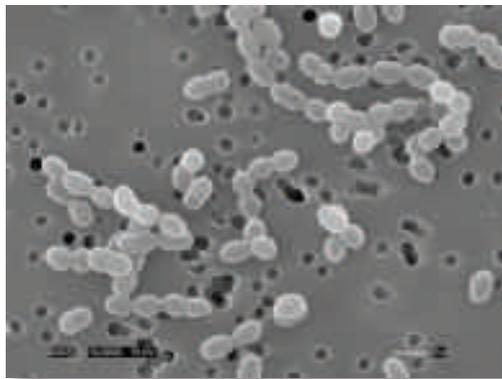


Figura 146 - *Leuconostoc mesenteroides*

Pediococcus (fig. 147) - são cocos homofermentativos, ocorrendo isoladamente, aos pares e em tétrades. Apresentam exigência em nutrientes (vitaminas e aminoácidos), podem ser encontrados em alimentos fermentados (picles, cerveja, vinho, etc.).

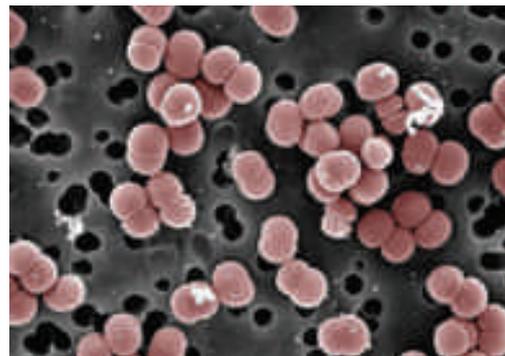


Figura 147 - *Pediococcus*



Streptococcus - são células esféricas que ocorrem aos pares ou em cadeia e são aeróbios facultativos. Bactérias homofermentativas, parte das quais tem importância nos alimentos. Fermentam a glicose produzindo, principalmente, ácido láctico. Esta característica faz com que seja importante nos alimentos, pois podem ser responsáveis por reações indesejáveis (leite cru), no entanto, em outras situações essas reações podem ser convenientes (leites fermentados).

As espécies mais importantes são **Streptococcus agalactiae**, que provoca a mastite nas vacas; **Streptococcus pyogenes**, causadora da escarlatina e outras doenças; **Streptococcus thermophilus** (fig. 148), utilizada na fabricação de queijos e iogurtes, **Streptococcus bovis**, que pode contaminar o leite pasteurizado; **Streptococcus lactis** (fig. 149), utilizada no fabrico de queijos, nata fermentada e manteiga; **Streptococcus faecalis** e **Streptococcus faecium** contaminam diversos alimentos, sobretudo lácteos, pois têm capacidade de viver em ambientes extremos. Os **Streptococcus** são amplamente distribuídos na natureza. Várias espécies foram recentemente reclassificadas, pertencendo agora aos gêneros: **Lactococcus**, **Enterococcus** e **Vagococcus**.

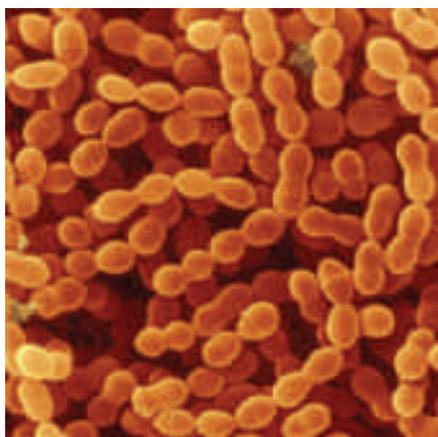


Figura 148 - *Streptococcus thermophilus*

Figura 149 - *Streptococcus lactis*

Vagococcus (fig. 150) - é também um gênero novo, contendo cocos gram positivos anteriormente classificados no gênero **Streptococcus**. São móveis (com flagelos peritríquios), catalase negativos. Podem ser encontrados em peixes, fezes, água e alimentos.



Figura 150 - *Vagococcus*



5 - Bacilos Gram Positivos Produtores de Esporos

Este grupo abriga os géneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*; produtores de esporos ou endósporos. O esporo (fig. 151) é constituído por um centro contendo material genético envolvido em várias camadas de mucopeptídeo e capas externas de natureza proteica. Os esporos são resistentes ao calor, a radiações ionizantes, a compostos químicos, a desidratação e ao congelamento.

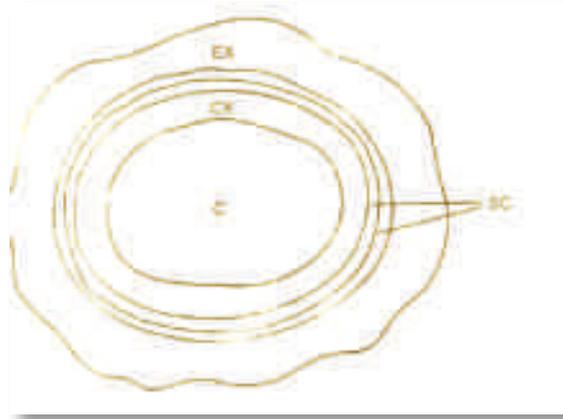


Figura 151 - Esquema de esporo bacteriano

A estrutura dos esporos bacterianos (fig. 152) é constituída por:

Região Central (C) - Protoplasto rico em Ca^{2+} e ácido dipicolínico e enzimas, DNA, RNA e outros minerais.

Córtex (Cx) - Camada que envolve a região central, composta de peptídeo glicano e mucopeptídeo.

Capas do esporo (SC) - envolvem o córtex e são constituídas principalmente, por proteínas e menores teores de hidratos de carbono e lípidos. Pode ter uma camada adicional.

Capas exterior (EX) - capa exterior de natureza proteica.

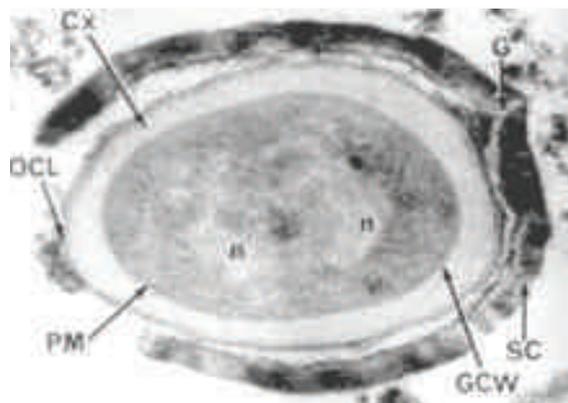


Figura 152 - Micrografia de esporo bacteriano



A reversão da forma do esporo para a forma vegetativa (germinação) pode resultar na multiplicação bacteriana e consequente deterioração do alimento ou produção de toxinas. Quando os esporos são transferidos para um meio ambiente favorável ao crescimento, ocorre a germinação, rompendo-se a parede do esporo. À medida que o esporo germina desenvolve-se uma nova célula vegetativa e a parede celular desprende-se.

O tamanho e localização dos esporos dentro das células não são os mesmos em todas as espécies. Alguns podem ser centrais, outros terminais e ou subterminais.

Bacillus - os microrganismos pertencentes a este género podem ser estritamente aeróbios a facultativos; alguns são proteolíticos potentes (ex. **Bacillus cereus**) enquanto outros têm fraca capacidade de degradação de proteínas (ou ser mesmo carentes de tal capacidade); parte é portadora de gás (**Bacillus polymyxa** e **Bacillus macerans** são as duas espécies mais importantes); finalmente, algumas das espécies são lipolíticas. As bactérias termófilas acidificantes, que alteram as conservas vegetais enlatadas, são capazes de produzir grandes quantidades de ácido láctico a partir do açúcar, sendo esta a razão pela qual se utilizam culturas de **Bacillus coagulans** na fabricação de ácido láctico. A fonte mais importante da maioria das espécies pertencentes a este género é o solo, no entanto podem ser encontrados na água, em material fecal e em diversos alimentos. São móveis e catalase positivo. Podem ser: psicotólicas, mesófilas, e termófilas (mínima de -5°C a 45°C, e máxima de 25 a 75°C). O pH de multiplicação é de 2,0 a 8,0. Desenvolvem-se em concentrações salinas de 2% a 5%. Este grupo abriga espécies patogénicas como **Bacillus cereus** (fig. 153), que causam gastroenterites de origem alimentar; espécies deterioradoras (**Bacillus subtilis** (fig. 154), **Bacillus stearothermophilus** e **Bacillus coagulans** (fig. 155) e espécies empregadas na produção de alimentos.



Fig. 153 - *Bacillus cereus*



Fig. 154 - *Bacillus subtilis*

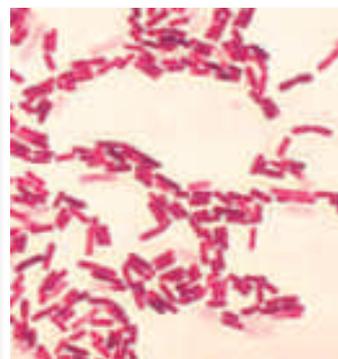


Fig. 155 - *Bacillus coagulans*



Clostridium - algumas das espécies deste género são potentes fermentadoras de hidratos de carbono, produzindo ácidos (o ácido butírico é um dos mais importantes) e gases (geralmente dióxido de carbono e hidrogénio). Existem espécies mesófilas e termófilas, algumas têm capacidade proteolítica e são quase todas anaeróbias. **Clostridium thermosaccharolyticum** é uma espécie sacarolítica, que provoca alterações, com produção de gás, nas conservas vegetais enlatadas. A putrefação de variados alimentos é muito frequente devida a espécies mesófilas proteolíticas pertencentes a este género, como são **Clostridium lentoputrescens**, **Clostridium butyricum**, uma espécie capaz de fermentar latatos, é responsável pela produção tardia de gás nos queijos curados. A maioria destes microrganismos têm origem no solo, embora também possam provir do estrume, mas podem ser encontrados no trato intestinal do homem, animais e alimentos. Os **Clostridium** com exceção de algumas espécies aerotolerantes, são anaeróbios estritos. São catalase negativos. Este género contém 2 espécies patogénicas que podem ser veiculadas por alimentos (**Clostridium botulinum** (fig. 154) e **Clostridium perfringens** (fig. 157). Contém muitas espécies deterioradoras (**Clostridium pasteurianum**, **Clostridium sporogenes**).

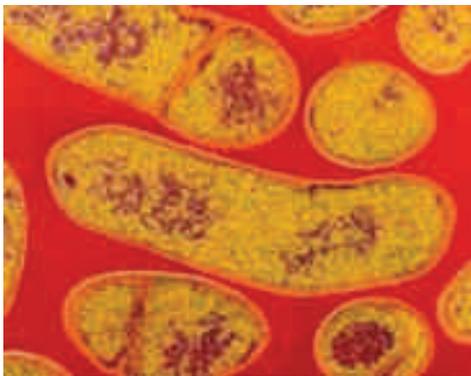


Figura 156 - *Clostridium botulinum*



Figura 157 - *Clostridium perfringens*

Desulfotomaculum - a espécie importante para alimentos é a **Desulfotomaculum nigrificans** (fig. 158), devido à sua capacidade de reduzir compostos sulfurados produzindo H_2S e é a espécie responsável pelo desagradável cheiro devido à produção do sulfeto de hidrogénio encontrado em



Figura 158 - *Desulfotomaculum nigrificans*



certas conservas enlatadas. Em alimentos enlatados, leva a formação de sulfeto ferroso, responsável pelo escurecimento do alimento. Encontram-se normalmente no solo, na água doce e no sistema digestivo dos ruminantes.

6 - Bacilos Gram Positivos Produtores Não Esporulados

Brochothrix - a espécie anaeróbica **Brochothrix thermosphacta** (fig. 159) é anaeróbia



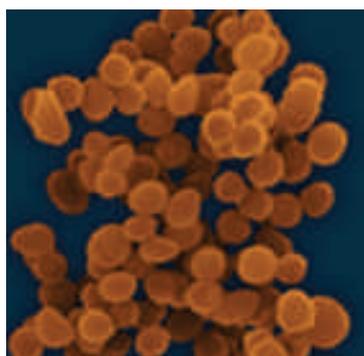
facultativa e psicrotrófica e responsável pela cor verde na carne degradada (fig. 160). É importante deteriorador de carnes curadas e derivados, embalados e refrigerados. **Brochothrix thermosphacta** é um bastonete Gram positivo, que se desenvolve a pH entre 5,5 a 8,5, resistente ao sal, liberta acetoína e ácido isobutírico.

Figura 159 - *Brochothrix thermosphacta*



Figura 160 - Carne degradada por *Brochothrix thermosphacta*

Carnobacterium - anteriormente era classificado como *Lactobacillus*, do qual difere por ser incapaz de utilizar citrato e de produzir ácido oléico. É encontrado em carnes e derivados embalados a vácuo, em peixes e aves.



A espécie **Carnobacterium piscícola** (fig. 161) encontra-se em peixes.

Figura 161 - *Carnobacterium piscícola*



Kurthia - a espécie mais importante é **Kurthia zopfii** (fig. 165), é utilizada como indicadora de temperatura inadequada na conservação de carnes. Em carnes mantidas a 2°C, este microrganismo não deve estar presente. É Gram positiva.



Figura 162 - *Kurthia zopfii*

Lactobacillus - são bacilos retos ou curvos, ocorrendo isolados em cadeias. Geralmente são imóveis e catalase negativos. A maioria é microaerófila, conhecendo-se alguns anaeróbios estritos. Fermentam os açúcares, produzindo maioritariamente ácido láctico (são homo e heterofermentativos). Necessita de nutrientes complexos e cresce melhor na presença de CO₂. Aqueles que são homofermentativos (**Lactobacillus bulgaricus** (fig. 163), **Lactobacillus helveticus**, **Lactobacillus lactis**, **Lactobacillus acidophilus** (fig. 164), **Lactobacillus casei** (fig. 164), **Lactobacillus termophilus** e **Lactobacillus delbrueckii**, entre outros) fermentam o açúcar dando, principalmente, ácido láctico e quantidades mínimas de ácido acético, dióxido de carbono e outros produtos em quantidades residuais. Os microrganismos heterofermentativos pertencentes a este género (**Lactobacillus brevis**, **Lactobacillus buchneri** e **Lactobacillus hilgardii**), além do ácido láctico, produzem quantidades significativas de compostos voláteis, entre os quais o etanol. Quase todas as espécies fermentam lactose para produzir ácido láctico, sendo por isso importantes nas indústrias de laticínios. As principais fontes destes microrganismos são a superfície das plantas, o estrume e os laticínios. São úteis na produção de alimentos mas podem ser deterioradores.



Figura 163 - *Lactobacillus bulgaricus*
importante na produção de iogurtes





Figura 164 - *Lactobacillus acidophilus* e
Lactobacillus casei

Listeria - são bacilos pequenos, microaerófilos, capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. A espécie mais importante é a **Listeria monocytogenes**, que é patogénica; causa diversas manifestações: septicemia que pode resultar em aborto, endocardite, conjuntivite, meningite, entre outras.

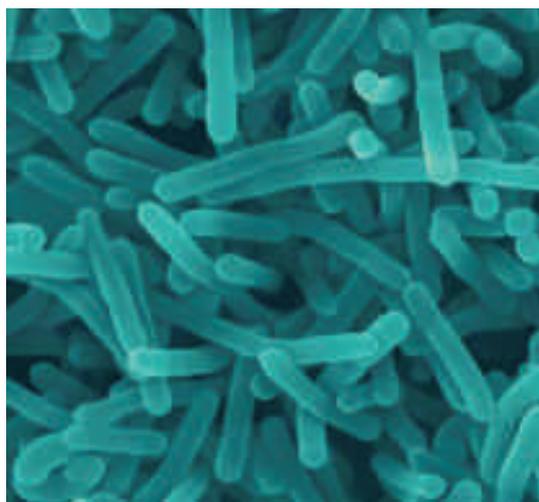


Figura 165 - *Listeria monocytogenes*

7 - Outras bactérias de interesse



Arthrobacter (fig. 166) - bacterias pleomórficas (coco-bacilares a bacilos), Gram variáveis, frequentemente observadas nos alimentos. São bactérias muito abundantes no solo, mas sem atividade na maioria dos alimentos. A sua principal particularidade é a capacidade de crescimento de algumas espécies a cerca de 5°C.

Figura 166 - *Arthrobacter*

Brevibacterium - **Brevibacterium linens** (fig. 167) é capaz de alterar as propriedades sensoriais de alguns queijos, provoca o aparecimento de manchas na superfície de





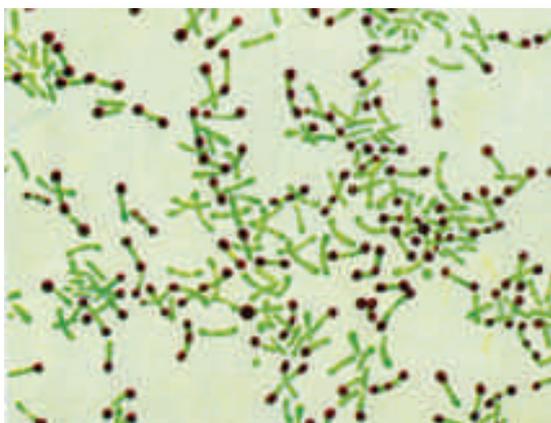
certos queijos (fig. 168) (ex. manchas vermelho-alaranjadas no queijo Limburger).

Figura 167 - *Brevibacterium linens*



Figura 168 - Queijo com manchas provocadas *Brevibacterium linens*

Corynebacterium (fig. 169) - bacilos Gram positivos, anaeróbios facultativos, largamente distribuídos na natureza, associados a processos de deterioração de vegetais e produtos cárneos. ***Corynebacterium diphtheriae*** espécie causadora da difteria, pode ser transmitida



pelos alimentos. ***Corynebacterium bovis*** espécie que cresce nos úberes das vacas, podendo contaminar o leite (fig. 170) , se a ordenha não for feita em condições de máxima assepsia.

Figura 169 - *Corynebacterium*

Figura 170 - Processo de contaminação do leite por *Corynebacterium bovis*



Coxiella - são bactérias que necessitam de um hospedeiro vivo para sobreviver. São agentes deterioradores e transmitidos pelo homem pela via alimentar. Pertencem à família **Rickettsiaceae**. **Coxiella burnetti** é agente etiológico da febre Q e pode ser veiculado pelo leite cru. O processamento térmico destrói esta bactéria.

Mycobacterium - o bacilo que produz a tuberculose, **Mycobacterium tuberculosis** (fig. 171) pode ser transmitido pelo leite cru proveniente de vacas infetadas e causar a doença. É rapidamente destruído pela pasteurização.

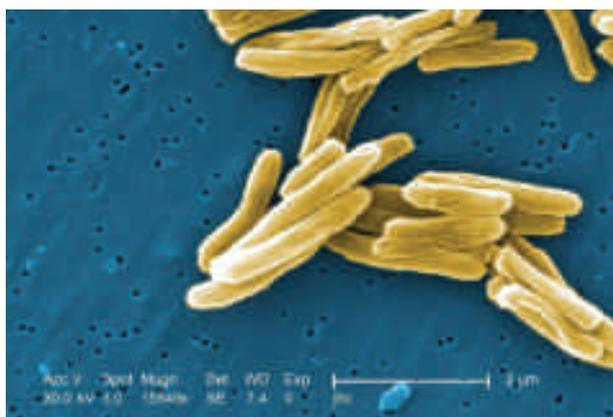


Figura 171 - *Mycobacterium tuberculosis*

Propionibacterium - importantes na produção de queijos devido à sua capacidade de produzir ácido propiónico e acético, além de outros ácidos orgânicos e CO₂. Porque fermentam o ácido láctico, hidratos de carbono e poliálcoois produzindo ácido propiónico, ácido acético e dióxido de carbono. No queijo Emmental, certas espécies (como **Propionibacterium freudenreichii**) fermentam os latatos para produzir o gás que favorece a formação dos buracos, contribuindo também para o sabor do queijo. As bactérias deste género que produzem pigmentos podem provocar colorações anormais no queijo.



Figura 172 - *Propionibacterium freudenreichii*



Figura 173 - Queijo Emmental com os buracos formados devido ao gás produzido por *Propionibacterium freudenreichii*



Devido à grande diversidade de microrganismos que podem ser transmitidos ao homem através do consumo de alimentos, é fundamental eliminar ou reduzir as populações microbianas responsáveis pela alteração dos mesmos (com perda de qualidades nutritivas) e pelo aparecimento de doenças. A manutenção da qualidade dos alimentos passa por uma correta manipulação, transformação, embalagem, armazenagem, transporte, distribuição e conservação durante a venda ao público e por cuidados na manipulação dos alimentos quer ao nível da produção quer ao nível dos consumidores no momento em que são consumidos.

O Plano de higiene deve ir ao encontro do cumprimento de leis, que ao contrário da ideia que normalmente é vulgarizada de que a segurança alimentar é algo que deve ser apenas assegurado pela indústria, a existência de sistemas de segurança alimentar é um requisito para todas as unidades industriais ou onde se proceda a preparação, a transformação, o fabrico, o embalamento, a armazenagem, o transporte, a distribuição, o manuseamento e a venda à disposição do consumidor de géneros alimentícios.

Assegurar a confiança dos consumidores é uma preocupação constante de todas as empresas, a garantia de segurança dos produtos que produzem e ou comercializam respeitando as condições sanitárias, com a mesma implementação de regras de higiene nas instalações e processos de fabrico torna-se assim fundamental no setor alimentar. A garantia de qualidade sanitária diz respeito ao controlo de todo o ciclo de produção, aos aspetos químicos, físicos e bacteriológicos das matérias-primas e dos produtos intermédios, aos modos de produção, de conservação e de transporte e por último, mas igualmente importante ao controlo dos produtos. Este tema vai ser aprofundado nos módulos seguintes.



Atividades – Exercícios

1. A interação existente entre os microrganismos e os alimentos pode ser classificada em três grupos.
Indique esta classificação.
2. A contaminação dos alimentos pode ter diversas origens.
Faça referência às fontes de contaminação de alimentos que estudou.
3. As leveduras que podemos encontrar nos alimentos, tal como os bolores, podem ser benéficas ou prejudiciais.
Dê exemplos da utilização benéfica e da atuação prejudicial de leveduras.
4. A maioria das leveduras com importância para a indústria alimentar desenvolve-se melhor em ambientes com elevado teor de humidade disponível, mais alto do que o requerido pelos bolores, embora mais baixo do que o necessário para as bactérias. Indique o valor favorável de a_w para as leveduras.
5. A temperatura e o pH são outros fatores que influenciam a atuação e desenvolvimento das leveduras.
Indique qual o intervalo de temperaturas e o pH favoráveis ao crescimento das leveduras.
6. O crescimento de bactérias, tanto no interior dos alimentos como na superfície dos mesmos, provoca-lhes um aspeto desagradável, podendo mesmo, nalguns casos, torna-los prejudiciais. Enuncie algumas modificações como consequência dos danos causados pelo crescimento indesejável de bactérias.
7. As bactérias importantes para a indústria alimentar podem ser agrupados em sete categorias. Mencione estas categorias:



8. A bactéria - ***Escherichia*** - encontrada nas fezes, cresce no intestino dos animais de sangue quente e é um dos microrganismos mais difundidos na natureza. A sua presença nos alimentos indica um tipo de contaminação, faça referência a esta contaminação.



4. DOENÇAS ALIMENTARES

Todos os anos, milhares de pessoas sofrem doenças de origem alimentar, como resultado da ingestão de alimentos aparentando sabor e cheiro perfeitamente normais, mas que na realidade se encontram contaminados por um grande número de bactérias perigosas ou pelas suas toxinas ou outros microrganismos.

A expressão “doenças de origem alimentar” é vulgar e tradicionalmente utilizada para designar um quadro sintomatológico, caracterizado por um conjunto de perturbações gástricas, envolvendo geralmente vômitos, diarreia, febres, dores abdominais (fig. 174), dores de cabeça, náuseas e desidratação, que podem ocorrer individualmente ou em combinação. Habitualmente, estes sintomas têm início de 1 a 36 horas após a ingestão do alimento contaminado, e mantêm-se durante 1 a 10 dias.



Figura 174 - Dor abdominais é um dos sintomas de doença alimentar

Os sintomas da intoxicação alimentar são: dores de cabeça, os vômitos abruptos, náuseas, dor abdominal, cólicas e diarreia. A intoxicação gastrointestinal normalmente melhora quando o contaminante ou a toxina é eliminada do organismo, os médicos nem sempre podem determinar a causa exata dos sintomas, se os sintomas persistirem mais de 48 horas pode ser necessário examinar uma amostra de fezes ou então por uma análise ao sangue, a amostra pode ser encaminhada para cultura de microrganismos para que estes possam ser classificados em laboratório.



As informações sobre a duração entre a refeição e o começo dos sintomas podem ajudar a diagnosticar o problema: menos que uma hora sugere que a toxina está envolvida, várias horas ou mais, suspeita-se que seja uma infecção bacteriana, mais que 12 horas é uma infecção viral.

Atualmente são conhecidas mais de 250 doenças transmitidas pelos alimentos. As causas das doenças de origem alimentar incluem vírus, bactérias, bolores, toxinas, parasitas, metais, príões, etc. Os sintomas vão desde uma gastroenterite passageira, a problemas neurológicos (botulismo), hepáticos (Hepatite A), e falhas da função renal (E.Coli O157:H7) capazes de pôr em risco a vida. As bactérias, pela sua diversidade e patogenicidade, constituem, de longe, o grupo microbiano mais importante e mais vulgarmente associado às doenças transmitidas pelos alimentos.

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos microrganismos patogénicos, causadores de diversas perturbações fisiológicas nas pessoas que os consomem. Os alimentos que, eventualmente, estejam contaminados por microrganismos causadores de doenças, ao serem ingeridos, permitem que os patogénicos ou os seus metabolitos invadam os fluídos ou os tecidos do hospedeiro causando algumas doenças graves, como a tuberculose ou a febre de Malta, também conhecida como febre ondulante, resultantes da ingestão, por exemplo, de leite não pasteurizado ou de queijos, em particular queijos frescos, contaminados por populações bacterianas, de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, ou por *Brucella abortus*, agentes respetivamente responsáveis pelas doenças referidas.

Os alimentos podem ser contaminados por microrganismos patogénicos para o homem, como resultado de deficientes condições de higiene durante o seu processamento, quer a partir de pessoas ou animais doentes, quer a partir de fezes provenientes de indivíduos infetados.

Os alimentos podem, também, constituir um perigo para a saúde pública, devido ao crescimento excessivo de populações bacterianas, à superfície ou no interior dos mesmos, oriundas do meio ambiente capazes de produzir toxinas (exotoxinas), que ao serem ingeridas com o alimento podem causar graves problemas.

Em menor escala, os bolores podem também ser responsáveis por doenças alimentares, devido à possibilidade de crescimento de determinadas espécies, capazes de produzir toxinas fúngicas, as micotoxinas, na superfície dos alimentos, nomeadamente, naquelas



situações em que as condições de conservação e armazenamento sejam defeituosas. Por outro lado, um alimento pode ficar contaminado com micotoxinas sem que, para isso, haja necessidade de ocorrência de crescimento de bolor no alimento. Trata-se de um caso curioso, em que determinados alimentos de origem animal (leite ou carne) poderão conter micotoxinas, caso sejam derivados de animais que se alimentaram de rações provenientes de produtos vegetais onde tivesse eventualmente, ocorrido a produção dessas micotoxinas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define doença de origem alimentar como sendo uma doença provocada por agentes que são transmitidos ao homem pela ingestão de água ou alimentos. Estas doenças são geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, provocadas por agentes microbianos que entram no corpo humano através da ingestão de alimentos ou de água.

As doenças de origem alimentar podem ser classificadas em três grupos:

Toxinfecções Alimentares - são doenças transmitidas pela ingestão de alimentos contaminados por bactérias, fungos, vírus, protozoários e seus respectivos produtos tóxicos.

Intoxicações Químicas - são doenças ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados por metais, agrotóxicos e substâncias raticidas e inseticidas usadas contra pragas.

Intoxicações Naturais - ocorrem por confusão na escolha de produtos semelhantes a espécies tóxicas de plantas e cogumelos, ou contaminação natural de peixes, moluscos e mexilhões com substâncias tóxicas.

As doenças provocadas por microrganismos patogênicos são geralmente denominadas de toxinfecções alimentares, pois este termo abrange o conjunto de situações de doença de origem alimentar, no entanto podem diferenciar-se em:

- **Infeção alimentar** - ocorre porque o microrganismo que existia no alimento multiplicou-se de tal forma que existe numa quantidade suficiente para causar doença. São causadas pela ingestão de microrganismos. Os sintomas aparecem após um período de incubação, iniciado pela ingestão do alimento, que pode durar umas horas, vários dias ou até semanas, pois é necessário tempo para que o microrganismo se multiplique e exerça a sua ação patogénica.



- **Intoxicação alimentar** - é causada pela ingestão de um alimento que possui toxinas ou substâncias tóxicas em quantidade suficiente para causar doença. As toxinas são substâncias tóxicas que podem ser produzidas por microrganismos e podem ter origem:
 - No próprio alimento - Em determinadas condições, alguns produtos vegetais (batatas, tomate, etc.), animais (nomeadamente alguns peixes) ou outros organismos (cogumelos venenosos), produzem toxinas que são ingeridas quando estes alimentos são consumidos.
 - Microbiana - Por vezes consomem-se alimentos onde previamente cresceu um microrganismo que produziu toxinas, e estas acabam por ser ingeridas juntamente com o alimento. O agente patogénico pode, inclusivamente ter desaparecido antes da ingestão do alimento, mas não as suas toxinas (ex. marisco contaminado por toxinas). As toxinas atuam diretamente sobre o trato gastrointestinal e os sintomas surgem poucas horas (duas a quatro) após a ingestão do alimento contaminado. Em determinados casos, pode-se produzir **alergias alimentares** somente causadas pela presença de microrganismos.
 - Química - O consumo prolongado de alimentos (incluindo água de consumo) contaminados com substâncias tóxicas de origem química, como são os casos dos metais pesados ou das dioxinas, pode resultar numa acumulação destes tóxicos o que, a médio/longo prazo, pode desencadear diversas doenças dos foros oncológico, neurológico, entre outros. Geralmente, estes tóxicos são transmitidos pela água, ar, solos, ou por materiais em contacto com os alimentos.
- **Toxinfecções alimentares** - ocorrem quando são ingeridos alimentos onde estão presentes microrganismos patogénicos em quantidade suficiente para causar infeção. Uma vez no intestino, estes microrganismos desenvolvem-se e produzem toxinas que são os responsáveis diretos pelos sintomas.

Por vezes, tal como acontece neste texto, utiliza-se o termo toxinfecção para designar qualquer tipo de envenenamento de origem alimentar, independentemente de se



tratar de infecção, intoxicação ou toxinfecção. Muitas destas doenças têm sintomas comuns (diarreias, dores abdominais, vômitos e desidratação), o que impossibilita a sua diferenciação, exclusivamente, pelos sintomas.

Além disso, estes mesmos sintomas são próprios de outras doenças de origem não alimentar, o que pode conduzir a diagnósticos errados. Para muitas das vítimas, a doença tem “apenas” como consequência desconforto e perda de tempo no seu emprego. Para outras, especialmente crianças na idade pré-escolar, idosos necessitados de cuidados de saúde e aqueles que possuem um sistema imunitário diminuído, as doenças causadas pelos alimentos podem ter consequências mais graves e, eventualmente chegar a causar situações de perigo de vida.

Qualquer que seja o impacto que as toxinfecções de origem alimentar possam ter em cada um de nós como indivíduo, o custo anual em termos de sofrimento, redução de produtividade e custos médicos está estimado em centenas de milhões de euros ou dólares.

As toxinfecções alimentares constituem um perigo para a saúde pública pela emergência de casos com consequências graves. O número real de casos de doença de origem alimentar em Timor é ainda desconhecido. Embora o registo de episódios de toxinfecções alimentares seja inferior à realidade, sabe-se que têm consequências negativas quer do ponto de vista da saúde, quer económico.

Em qualquer caso, as toxinfecções dependem do tipo de microrganismo causador de doença e dos seguintes fatores:

1. **Grau de contaminação do alimento**, ou seja, número de microrganismos presentes no organismo e que são ingeridos.
2. **Multiplicação dos microrganismos** dentro do organismo. Além do mecanismos de defesa, os microrganismos precisam encontrar condições físicas ideais para a sua multiplicação.
3. **Quantidade de toxinas produzidas** pelo microrganismo que existam no alimento ou produzidas dentro do organismo (no caso de intoxicações).
4. **Sensibilidade individual à ação dos agentes causadores** de doença (estado de saúde, idade avançada, grupos de risco, etc.).



Tipos e fontes de contaminação

As doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados, depende grandemente do tipo de contaminação (fig. 175) e das fontes às quais o alimento esteve exposto e que levaram à sua contaminação.



Figura 175 - Os três tipos de contaminações de alimentos

Existem três **tipos de contaminação**:

- **Contaminação física** - ocorre pela queda de um objeto estranho no alimento como, por exemplo, um cabelo, um inseto (fig. 176), pedaços de embalagens, etc.



Figura 176 - Insetos a contaminar vegetais

- **Contaminação química** - ocorre quando qualquer substância química ou um seu resíduo entra em contacto com um alimento, por exemplo por má utilização de detergentes e desinfetantes (fig. 177), resíduos de pesticidas, metais pesados, etc.





Figura 177 - Detergentes e desinfetantes

- **Contaminação biológica** - é aquela que ocorre pela atividade de microrganismos (fig. 178), especialmente bactérias.



Figura 178 - Alimentos crus em contato com alimentos que não vão sofrer qualquer tratamento antes do consumo podem sofrer contaminação cruzada

Fontes de contaminação dos alimentos:

- Solo e água.
- Plantas.
- Utensílios.
- Trato intestinal do homem e animais.
- Manipuladores de alimentos.
- Ração animal.
- Pele dos animais.
- Ar e pó.



Independentemente da origem, é importante referir que o Homem, como manipulador de alimentos, é o principal causador ou veículo de transmissão de doenças de origem alimentar, quer por práticas de higiene incorretas (fig. 179), quer pela falta de conhecimentos básicos sobre higiene e segurança alimentar, quer ainda por descuido.

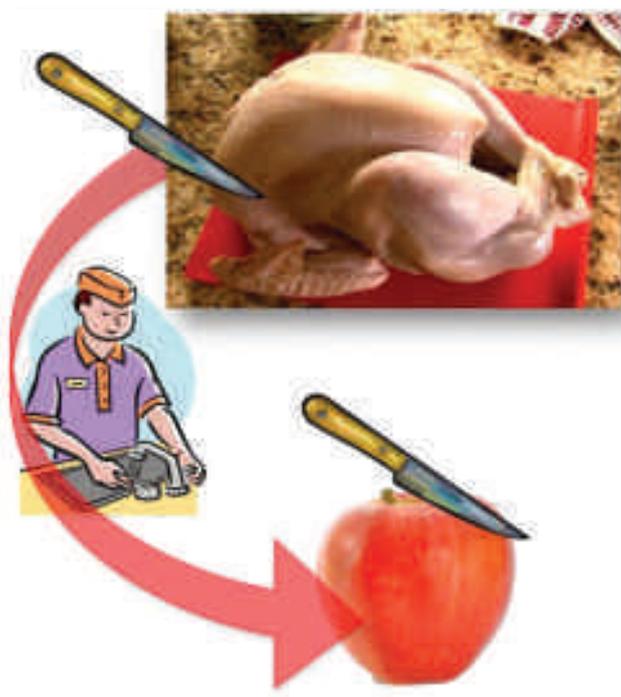


Figura 179 - Contaminação cruzada causada pela utilização do mesmo utensílio para cortar alimentos naturalmente contaminados (carnes cruas) e fruta que vai ser consumida sem tratamento posterior ao corte

De acordo com os estudos estatísticos da Organização Mundial da Saúde, das doenças de origem alimentar, mais de 60% dos casos decorrem de técnicas inadequadas de processamento e contaminação dos alimentos servidos em restaurantes.

4.1. Microrganismos Patogénicos

Os alimentos podem ser contaminados por vários agentes que constituirão um perigo para a saúde do consumidor. A ingestão de alimentos contaminados provoca geralmente uma doença de origem alimentar.

Existem diversos tipos de microrganismos que podem ser responsáveis por toxinfecções alimentares: **bactérias**, **vírus**, **leveduras** e **bolores**. As bactérias são as mais perigosas



para a saúde pública, causando uma maior percentagem de doenças de origem alimentar do que os outros microrganismos. Existem algumas condições que contribuem para o crescimento bacteriano, tais como:

- **Nutrientes/alimento** - as bactérias desenvolvem-se mais facilmente nos alimentos que constituem um meio nutritivo para elas, como é o caso das carnes, pescado, ovos e lacticínios (fig. 180).



Figura 180 - Carnes, pescado e lacticínios

- **Temperatura** - a temperatura mais favorável para a multiplicação de bactérias é a temperatura do corpo humano (37°C) mas podem multiplicar-se facilmente entre os 5 e 65°C , sendo este intervalo considerado a “zona de perigo”(fig. 181). As temperaturas elevadas (entre 90 - 100°C) geralmente eliminam a maioria das bactérias, se aplicadas por um período de tempo suficiente (15 minutos no mínimo). Abaixo de 5°C , a temperatura de refrigeração, as bactérias não morrem mas também não se multiplicam. Assim, deve evitar-se que os alimentos permaneçam demasiado tempo entre os 5 e 65°C para evitar a multiplicação bacteriana.



Figura 181 - Termómetro com indicação da zona de perigo



- **Humidade** - a maior parte das bactérias necessita de água para poder utilizar os nutrientes, sendo a humidade um fator de crescimento bacteriano. Os alimentos secos, como o feijão (fig. 182), grão, arroz, têm menor probabilidade de serem contaminados por bactérias.



Figura 182 - Diferentes variedades de feijão seco, muito resistentes a contaminações

- **Acidez** - A maioria das bactérias não se desenvolve em meios ácidos. Por isso, ao adicionarmos vinagre, vinho, limão ou outros componentes ácidos aos alimentos podemos evitar a multiplicação de algumas bactérias. Um bom exemplo é o método de conserva em meio ácido, como os pickles (fig. 183).



Figura 183 - Pickles

- **Oxigénio** - a presença de oxigénio é essencial para o crescimento de grande parte das bactérias, no entanto existem outras que não necessitam de oxigénio para se multiplicarem. As bactérias que crescem sem oxigénio podem até tornar-se mais perigosas pelo facto de crescerem em alimentos enlatados (fig. 184) ou outras conservas.





Figura 184 - Alimentos enlatados

- **Tempo** - as bactérias precisam de tempo para se multiplicarem, apesar de o fazerem com uma elevada rapidez. Quanto maior for o tempo entre tarefas realizadas à temperatura ambiente (na zona de perigo), maior será a probabilidade de ocorrer uma toxinfecção alimentar pois damos o tempo suficiente à bactéria para ela se multiplicar ou produzir toxinas. Ou seja, um alimento já confeccionado que seja deixado à temperatura ambiente e que esteja contaminado por um pequeno número de bactérias poderá ter centenas delas passado algumas horas, já que estas se multiplicam muito rapidamente.

1. Perigos Biológicos

Estima-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos. Estes podem encontrar-se em quase todos os alimentos, mas a sua transmissão resulta, na maioria dos casos, da utilização de práticas erradas nas últimas etapas da sua confeção ou distribuição. Embora se conheçam mais de 250 tipos diferentes de bactérias, vírus e parasitas causadores de doenças de origem alimentar, apenas alguns aparecem frequentemente. De acordo com o *National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods* (N.A.C.M.C.F.), EUA (2004), estes microrganismos podem-se classificar segundo o seu perigo e difusão (quadro 5).

As toxinfecções alimentares podem ter origem biológica ou não biológica. Os microrganismos patogénicos causadores de situação de doença por ingestão de alimentos podem ser bactérias, fungos, vírus, parasitas, priões ou por toxinas de origem biológica produzidas por microrganismos.



Quadro 5 - Classificação dos microrganismos de acordo com o seu risco e difusão segundo o *National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods* (N.A.C.M.C.F.), EUA (2004).

Risco severo	Risco Moderado / Alta difusão	Risco moderado / Difusão limitada
<i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B, E, F	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Salmonella paratyphi</i> A, B	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica (EEC)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Vírus das hepatites A e E	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Vibrio cholera</i> non-01
<i>Brucella abortus</i>	Rotavírus	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Brucella suis</i>	Vírus Norwalk	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Vibrio cholerae</i> 01	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Diphyllobothrium latum</i>	<i>Taenia saginata</i>
<i>Taenia solium</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	
<i>Trichinella spiralis</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	

Quando se estudam as toxinfecções de origem alimentar, é conveniente saber quais os alimentos que, com mais frequência, estão associados a surtos ou a casos de envenenamento alimentar de origem microbiana, assim como, qual ou quais os principais agentes tóxicos ou infecciosos presentes nesses alimentos. É ainda conveniente saber quais os principais sintomas associados aos principais casos. O quadro 6 apresenta alguns alimentos frequentemente envolvidos em situações de toxinfecção alimentar e os principais agentes associados.



Quadro 6 - Alimentos e agentes causadores de toxinfecções alimentares geralmente associados.

Alimento	Microrganismos geralmente associados
Frutos do mar crus	<i>Vibrio</i> sp., vírus Hepatite A, <i>Norovirus</i> (Norwalk like viruses)
Ovos crus	<i>Salmonella</i>
Carnes pouco cozinhadas	<i>Salmonella</i> e <i>Campylobacter</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i>
Leite ou sumos não pasteurizados	<i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia</i>
Queijos moles não pasteurizados	<i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Listeria</i> sp.
Conservas caseiras	<i>Clostridium botulinum</i> (botulismo)
Salsichas; fiambres, etc.	<i>Listeria</i> sp.

Bactérias

As bactérias são os principais causadores de doenças de origem alimentar, não só em número como em frequência, embora outros agentes como os vírus ou parasitas também as possam provocar.

As bactérias são microrganismos unicelulares com uma estrutura muito simples, o que lhes permite replicarem-se muito rapidamente caso encontrem nutrientes, temperatura, pH, humidade e concentração de oxigénio favoráveis. Nalguns casos, apenas 20 minutos são suficientes para que o número de bactérias duplique, o que significa que um número inicial de 10 bactérias num determinado alimento, em condições favoráveis, se multiplicará de tal modo que se formarão 640 bactérias ao fim de 2 horas.

Geralmente, as infeções bacterianas de origem alimentar são referidas simplesmente como **infeções alimentares**. Os principais sintomas são diarreias, dores abdominais, vómitos, desidratação e, por vezes, febre.

Aparecem após um período de incubação que pode durar umas horas ou vários dias e podem prevalecer durante um período que pode variar entre um dia e uma semana.



Bactérias responsáveis por toxinfecções alimentares graves:

Mais frequentes:

- **Salmonella** (presente em: ovos (fig. 185), animais de capoeira e outras carnes, leite cru e chocolate).
- Nas últimas décadas, a *Salmonella* tem estado na origem da maioria dos casos de infeções alimentares, geralmente resultantes da ingestão de ovos, carne de animais de capoeira e outras carnes, leite cru e chocolate.

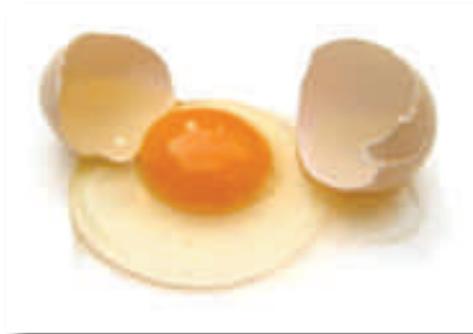


Figura 185 - Ovos sem controlo de qualidade podem transmitir Salmonella

- **Staphylococcus aureus** (presente em: produtos de salsicharia (fig. 186), presunto, refeições pré-cozinhadas e cremes de pastelaria (contaminados por manipuladores), leite e derivados, aves, peixe, crustáceos e gelados).



Figura 186 - Produtos de salsicharia podem ser contaminados por Staphylococcus aureus

- **Clostridium perfringens** (presente em: carnes de vaca e aves, molhos, legumes cozidos (fig. 187) e derivados a que se tenha seguido arrefecimento lento). Quando o crescimento do microrganismo no trato gastrointestinal está associado a produção de toxinas, ocorre uma **toxinfecção bacteriana**, sendo o *Clostridium perfringens*, um dos seus agentes mais frequentes.



Figura 187 - Legumes cozidos



Menos frequentes:

- ***Clostridium botulinum*** (presente em: peixe fumado (fig. 188) ou em salmoura, presuntos crus e enchidos de carne).

Figura 188 - Salmão fumado



- ***Bacillus cereus*** (presente em: legumes, produtos à base de cereais (farinhas (fig. 189) e féculas), derivados de leite, condimentos e molhos).

Figura 189 - Farinhas



- ***Listeria monocytogenes*** (presente em: leite cru, leite pasteurizado posteriormente contaminado (fig. 190), queijos, gelados e saladas). Embora ainda com baixa incidência, o aparecimento de casos de infecções por *Listeria monocytogenes* (geralmente proveniente de leite cru, leite pasteurizado posteriormente contaminado, queijos, gelados e saladas), nas últimas décadas tem trazido preocupações, dado que esta bactéria pode provocar danos severos ou mesmo fatais em bebês, crianças, mulheres grávidas, idosos e indivíduos imunodeprimidos. Acresce ainda, o fato desta bactéria conseguir crescer a temperaturas tão baixas como as de um frigorífico.

Figura 190 - Leite e produtos derivados



- ***Campylobacter jejuni*** (presente em: leite cru, animais de capoeira crus ou mal cozinhados, água de consumo (fig. 191). No entanto, a prevalência de infecções



por *Campylobacter jejuni* (potencialmente presente em leite cru, animais de capoeira crus ou mal cozinhados e em água de consumo) tem aumentado de tal modo nos últimos anos que, nalguns países, chega a rivalizar com a *Salmonella*.

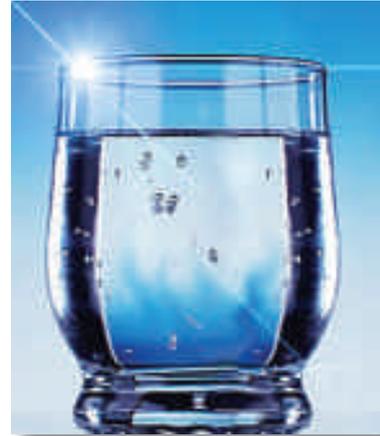


Figura 191 - Água de consumo contaminada

- ***Escherichia coli*** (o seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. A presença da *E. coli* em água ou alimentos é indicativa de contaminação com fezes humanas).
- ***Yersinia enterocolitica***
- ***Shigella spp***
- ***Vibrio parahaemolyticus***

As intoxicações provocadas por *Yersinia enterocolitica* e por algumas estirpes de *Escherichia coli* têm-se tornado prevalentes nos últimos anos, embora existam outras bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, ou *Bacillus cereus*, implicadas em intoxicações alimentares.

Relativamente às toxinfecções de origem bacteriana, verifica-se que existem quatro agentes que são os mais frequentemente responsabilizados pelos casos de toxinfecção coletiva: *Salmonella*; *Clostridium perfringens*; *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter*.

Vírus

São mais pequenos que as bactérias e necessitam de um hospedeiro para se multiplicarem. Embora não se multipliquem nos alimentos, a sua destruição apenas ocorre quando estes são bem cozinhados.

Os vírus são agentes infecciosos com uma organização muito simples: uma capa proteica e um ácido nucleico (DNA ou RNA) no seu interior. São muito mais pequenos do que as bactérias e para se multiplicarem requerem que uma célula viva, de uma espécie para a qual são específicos, lhes sirva de hospedeiro.



Alguns vírus são causadores de doenças de origem alimentar. Embora não se multipliquem nos alimentos (por serem específicos para as células humanas), a sua destruição também não ocorre a não ser que os alimentos sejam devidamente cozinhados. A sua especificidade também implica que os vírus que infetam animais, como é o caso do vírus da peste suína, não representem quaisquer perigos para a saúde humana sendo o seu controlo justificado apenas por uma questão de sanidade animal.

Os vírus mais frequentemente implicados em doenças de origem alimentar são os da hepatite A e da hepatite E, o rotavírus (principal causa de diarreia infantil) e os vírus da família Norwalk (que provocam gastroenterites). O quadro 7 apresenta as principais características das doenças causadas por estes vírus.

Quadro 7 - Caracterização das doenças de origem alimentar causadas por vírus

Vírus	Período de incubação	Sintomas	Período de duração da doença	Alimentos mais implicados
Hepatite A	28 dias	Fraqueza, diarreia, cólicas, icterícia	2 semanas a 3 meses	Não especificados
Hepatite E	6 semanas	Fraqueza, diarreia, cólicas, icterícia	1 mês	Água
Rotavirus	1-3 dias	Vómitos, diarreia líquida e febre moderada	48 horas	Não especificados
Norwalk	14-48 horas	Náuseas, vômitos em jacto, dores abdominais, diarreia, febre, mialgias e dores de cabeça	12 horas a 3 dias	Não especificados
Astrovirus	10-72 horas	Vómitos, diarreia líquida e febre moderada	2 a 9 dias	Não especificados



Os moluscos como as ostras, os mexilhões, as amêijoas e o berbigão (fig. 192), apanhados junto à costa em zonas poluídas, são os principais alimentos implicados em viroses de origem alimentar. Os frutos e as saladas são outro grupo de alimentos frequentemente associados às toxinfecções. A contaminação destes produtos ocorre normalmente durante a sua produção devido à utilização de excrementos humanos como fertilizantes.



Figura 192 - Mariscos podem ser portadores de vírus

Parasitas

Os vermes e os protozoários são parasitas, isto é, organismos que vivem sobre ou no interior de outro organismo (o hospedeiro) beneficiando desta associação enquanto prejudicam o hospedeiro do qual geralmente obtêm nutrientes. Os parasitas alimentam-se do hospedeiro sem contribuir para a sua sobrevivência (prejudicam ao organismo hospedeiro).

As doenças de origem alimentar provocadas por estes parasitas são muito menos frequentes do que as de origem bacteriana. Estes parasitas, que são muito maiores do que as bactérias, podem crescer e atingir o estado adulto no trato gastrointestinal do homem, ou ser diretamente ingeridos por consumo de tecidos de animais contaminados. Nalguns casos, os sintomas podem durar várias semanas ao fim das quais diminuem ou desaparecem para, posteriormente, reaparecerem.

Os vermes são parasitas de corpo alongado ou achatado e sem esqueleto interno ou externo. E os protozoários são seres unicelulares, na maioria heterotróficos e com mobilidade especializada.

Entre os principais parasitas causadores de doenças de origem alimentar encontram-se *Giardia lamblia* (*G. intestinalis*), *Cryptosporidium parvum* (protozoários) e *Trichinella*



spiralis (verme). O quadro 8 apresenta as principais características das doenças causadas por estes parasitas.

Quadro 8 - Caracterização das doenças de origem alimentar causadas por parasitas

Vírus	Período de incubação	Sintomas	Período de duração da doença	Alimentos mais implicados
<i>Giardia lamblia</i> (<i>G. intestinalis</i>)	2 dias	Diarreia, náuseas, dores abdominais e flatulência	Meses (sem tratamento)	Água, salmão, frutos e vegetais
<i>Cryptosporidium parvum</i>	10 dias	Diarreia, cólicas abdominais, febre baixa e dores de cabeça	variável	Água
<i>Trichinella spiralis</i>	1-2 dias 2 - 8 semanas (infecção larvar)	Náuseas, diarreia, vômitos, cansaço, febre e dores abdominais	variável	A carne de porco ou os seus derivados consumidos crus ou cozinhados de forma insuficiente

Priões

O prião é uma partícula proteica infecciosa com capacidade de modificar outras proteínas tornando-as cópias de si própria. Algumas doenças produzidas pelos priões são: Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSE), como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE-doença das “vacas loucas”) e a sua variante humana, o scrapie dos carneiros e das cabras e a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD). É constituído por uma proteína modificada que, por contacto com uma proteína sã, a modifica, convertendo-a numa proteína patogénica que, por sua vez, vai modificar outra proteína sã, produzindo uma reacção em cadeia.



Toxinas de origem biológica

1 - **Toxinas de origem não bacteriana** - são toxinas de origem natural que podem produzir doenças no organismo, estas são:

- As **micotoxinas** - metabolitos que crescem em muitos bolores conhecidos. São colocadas neste grupo todas as micotoxinas, toxinas produzidas por algas e todas as toxinas produzidas pelos alimentos. As micotoxinas resultam do crescimento de muitos dos bolores conhecidos.
- As **aflatoxinas** - produzidas por *Aspergillus flavus* e por *Aspergillus parasiticus*, em nozes, amendoins (fig. 193) e outras sementes oleosas, são as micotoxinas mais frequentes e mais graves, tendo algumas delas uma potente ação cancerígena. Outras micotoxinas como a *ocratoxina A*, a patulina e as fumosinas procedentes de outras espécies de bolores, como *Penicillium* e *Fusarium*, são muito menos tóxicas.



Figura 193 - Frutos secos podem desenvolver bolores produtores de aflatoxinas

- A **muscarina** - substância perigosa presente em cogumelos (fungos venenosos), pode causar intoxicação resultante da ingestão de qualquer uma das muitas espécies existentes de cogumelos venenosos (fig. 194). O potencial de intoxicação pode variar dentro da mesma espécie, em diferentes momentos da época de crescimento e conforme se cozinham.



Figura 194 - Cogumelos do género *Inocybe*-*Inocybe lanuginosa* e *Inocybe bongardii*



- A intoxicação pela cravagem do centeio, acontece ao ingerir **cereais** contaminados pelo fungo *Claviceps purpúrea* (fig. 195). Este fungo é o responsável por uma doença designada ergotismo, também conhecido por “Envenenamento por Ergot” e “Fogo de Santo António”.



Figura 195 - Espiga de cereal infectada pelo fungo *Claviceps purpurea*

A intoxicação por **produtos do mar** pode ser provocada por peixes ou mariscos. Normalmente, a intoxicação por peixes resulta de uma de três toxinas: **ciguatera**, **tetrodotoxina** ou **saxitoxina**.

- A toxina **ciguatera** é produzida por determinadas algas microscópicas que servem de alimento aos peixes marinhos com barbatanas, de regiões subtropicais ou tropicais (fig. 196), e que acumulam-se na sua carne. Entre os peixes mais associados à **ciguatera** podemos citar: garoupa, barracuda, vermelho, cângulo e cavala.

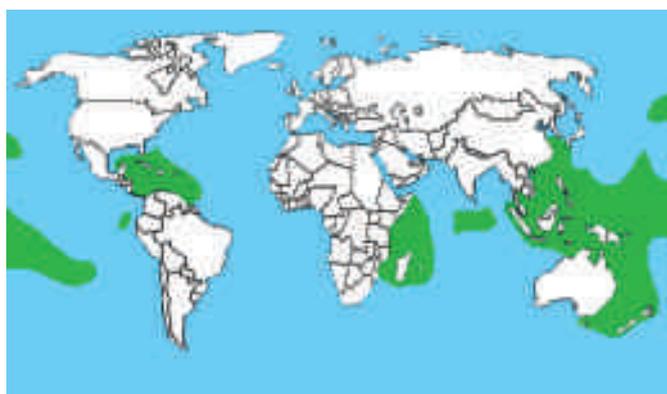


Figura 196 - Zonas de incidência da toxina ciguatera

- A toxina **saxitoxina** é um polipeptídeo neurotóxico produzido por alguns dinoflagelados (algas celulares sem parede celular), algumas algas que são conhecidas por provocarem as marés vermelhas. Esta toxina é filtrada e retida por mexilhões (fig. 197), ostras e outros bivalves sem que isso lhes cause quaisquer



malefícios. No entanto, a ingestão por humanos de bivalves contaminados pode provocar uma intoxicação aguda muito grave conhecida por Paralytic Shellfish Poisoning - (intoxicação paralisante por mariscos). Esta toxina, tal como a ciguatera, continua ativa, inclusivamente depois de se ter cozinhado o alimento.



Figura 197 - Mexilhões

- A **tetrodotoxina** é uma potente toxina de origem marinha, produzida por várias espécies animais, mas especialmente pelo peixe globo (fig. 198). Este peixe, que se encontra sobretudo nos mares do Japão, constitui uma refeição muito apreciada nos países asiáticos. Como apresenta uma elevada toxicidade, é também usado por muitos com o objetivo de suicídio.



Figura 198 - Peixe globo

- A intoxicação pela **histamina** (envenenamento escombroides), procedente de peixes como a cavala, o atum (fig. 199) e a albacora, acontece quando os tecidos destes peixes se decompõem depois da sua captura e libertam altos teores de histamina. Depois da sua ingestão, a histamina provoca uma vermelhidão facial imediata. O teor de histamina em determinados produtos de pesca está regulamentado a nível europeu.



Figura 199 - Atum



Para além destes microrganismos causadores de toxinfecções e das toxinas referidas existem outros microrganismos, vírus, parasitas e toxinas que embora a nível mundial não tenham grande expressão, podem causar danos muito graves nas zonas da sua incidência. No final deste manual encontra-se um Glossário de Microrganismos no qual se inclui informação detalhada sobre microrganismos não mencionados e sobre alguns microrganismos já referidos.

4.2. Prevenção de doenças de origem alimentar

A causa mais comum das doenças de origem alimentar é a preparação prévia dos alimentos com demasiada antecedência e o seu mau armazenamento, a temperaturas incorretas.

As bactérias crescem melhor entre os 5-63°C. A maior parte das bactérias não formadoras de esporos são mortas a 70°C. As bactérias não crescem, ou apenas muito lentamente a temperaturas abaixo dos 5°C. Algumas bactérias morrem a temperaturas muito baixas, mas muitas delas sobrevivem e multiplicam-se quando as condições quentes são retomadas. As bactérias patogénicas causadoras de intoxicações alimentares podem ser muito perigosas e podem até levar á morte, apesar de que na maior parte dos casos causam doença que eventualmente desaparece.

Os sintomas de uma intoxicação alimentar (fig. 200) podem durar dias e manifestam-se através de dores abdominais, diarreia, vómitos, náuseas e febre. Os sintomas normalmente surgem repentinamente, mas podem também aparecer dias depois da ingestão do alimento contaminado, dificultando a identificação da sua fonte.



Figura 200 - Intoxicações alimentares podem levar a hospitalização



Bactérias patogénicas causadoras de infeções alimentares são muito difíceis de detetar, pois não afetam o sabor ou o cheiro da comida. Os grupos particularmente vulneráveis a doenças de origem alimentar são crianças, idosos, doentes e grávidas, neste último caso o feto pode ser afetado (no caso de algumas contaminações) e sofrer alterações genéticas irreversíveis.

A prevenção de doenças de origem alimentar só é possível quando reconhecemos e sabemos quais as principais causas que estão na sua origem. Assim deve-se ter em atenção quando se manipula alimentos que situações de doença alimentar podem surgir quando se:

1. Utilizam ingredientes contaminados;
2. Adota práticas inadequadas na manipulação e preparação de alimentos; como a confeção insuficiente para destruição das bactérias; uso de restos de comida ou inadequada reutilização de sobras;
3. Refrigera inadequadamente os alimentos, como o arrefecimento à temperatura ambiente por tempo prolongado;
4. Prepara as refeições com uma antecedência excessiva;
5. Contaminação devida a manipulação por pessoas infetadas;
6. Transfere a contaminação a partir de alimentos crus ou de superfícies ou equipamentos contaminados, para alimentos prontos a consumir (contaminação cruzada);
7. Higiene e desinfeção incorreta ou insuficiente de superfícies de contato com os alimentos, câmaras de refrigeração, instalações e do próprio manipulador.

Na prevenção do aparecimento de casos de doença com origem alimentar, as medidas a tomar para diminuir o risco de contaminação alimentar e evitar o aparecimento deste tipo de doenças, são os seguintes:

1. Ter matérias-primas de qualidade e mantê-las isentas de contaminações.
2. Evitar a multiplicação bacteriana ao longo de todas as fases de produção de alimentos.
3. Confeccionar os alimentos de forma a eliminar as bactérias existentes.



A Organização Mundial de Saúde definiu de forma sintética 10 regras de ouro para a preparação de alimentos. Pela sua abrangência e versatilidade podem ser adotadas, de acordo com as condições de aquisição, processamento e consumo, como regras de prevenção que permitem melhorar a segurança dos géneros alimentícios e deste modo contribuir para a prevenção da ocorrência de doenças de origem alimentar.

Dez regras de ouro da OMS

1. Selecionar cuidadosamente os alimentos;
2. Os alimentos devem ser completamente cozinhados;
3. Consumir o mais breve possível os alimentos após a sua confeção;
4. O armazenamento dos alimentos deve ser efetuado de acordo com as suas características e corretamente acondicionados;
5. O reaquecimento dos alimentos deve ser completo;
6. Evitar o contacto entre alimentos crus e cozinhados;
7. Lavar as mãos sempre que necessário e repetidamente;
8. Manter todas as superfícies e utensílios que contactem com os alimentos devidamente higienizados;
9. Proteger os alimentos de insetos, roedores e outros animais;
10. Utilizar sempre água potável.

Este tema será novamente abordado nos módulos seguintes devido à sua pertinência.



Atividades – Exercícios

1. Todos os anos, milhares de pessoas sofrem doenças de origem alimentar, como resultado da ingestão de alimentos aparentando sabor e cheiro perfeitamente normais, mas que na realidade se encontram contaminados por um grande número de bactérias perigosas ou pelas suas toxinas ou outros microrganismos. Quais os sintomas da intoxicação alimentar?
2. Atualmente são conhecidas mais de 250 doenças transmitidas pelos alimentos. As causas das doenças de origem alimentar incluem vírus, bactérias, bolores, toxinas, parasitas, metais, priões, etc. Os sintomas vão desde uma gastroenterite passageira, a problemas neurológicos (botulismo), hepáticos (Hepatite A), e falhas da função renal (E.Coli O157:H7) capazes de pôr em risco a vida. As bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem, de longe, o grupo microbiano mais importante e mais vulgarmente associado às doenças transmitidas pelos alimentos. Como é que os alimentos podem causar doença?
3. As doenças de origem alimentar podem ser classificadas em três grupos. Quais são estes três grupos?
4. As doenças provocadas por microrganismos patogénicos são geralmente denominadas de toxinfecções alimentares, pois este termo abrange o conjunto de situações de doença de origem alimentar, no entanto podem diferenciar-se em infeções ou intoxicações. Qual é a diferença entre elas?
5. As toxinas transmitidas pelos alimentos podem ter diversas origens. Indique quais as origens das substâncias tóxicas nos alimentos.
6. Como ocorrem as toxinfecções alimentares?



7. As toxinfecções dependem do tipo de microrganismo causador de doença e de alguns fatores.

Quais são estes fatores?

8. As doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados, depende grandemente do tipo de contaminação e das fontes às quais o alimento esteve exposto e que levaram à sua contaminação.

Quais os três tipos de contaminação de alimentos?

9. De acordo com os estudos estatísticos da Organização Mundial da Saúde, das doenças de origem alimentar, mais de 60% dos casos decorrem de técnicas inadequadas de processamento e contaminação dos alimentos servidos em restaurantes.

Qual a principal fonte de transmissão de doenças de origem alimentar?

10. Algumas toxinas são de origem não bacteriana.

Dê exemplos destas toxinas.

11. A prevenção de doenças de origem alimentar só é possível quando reconhecemos e sabemos quais as principais causas que estão na sua origem. Assim deve-se ter em atenção quando se manipula alimentos determinadas regras.

Quais os cuidados a ter na manipulação de alimentos de forma a prevenir doenças de origem alimentar?

12. A Organização Mundial de Saúde definiu de forma sintética 10 regras de ouro para a preparação de alimentos. Pela sua abrangência e versatilidade podem ser adotadas, de acordo com as condições de aquisição, processamento e consumo, como regras de prevenção que permitem melhorar a segurança dos géneros alimentícios e deste modo contribuir para a prevenção da ocorrência de doenças de origem alimentar.

Quais as dez regras de ouro da OMS?



5. PRÁTICAS LABORATORIAIS

Os microrganismos são seres vivos que se encontram praticamente em todo o lado e que possuem dimensões tão reduzidas que só podem ser vistos com o auxílio de um microscópio. Por vezes conseguimos ver pontos brancos ou coloridos ou filamentos nos alimentos que constituem agregações desses microrganismos. Em geral, estes seres são inofensivos e alguns deles podem inclusivamente ter uma ação benéfica para o Homem, como por exemplo aqueles que são usados na produção de iogurte ou queijo (fig. 199).



Figura 201 - O leite por ação de microrganismos pode ser transformado em iogurte e queijo

No entanto, existem alguns que podem ser prejudiciais por contribuírem para a alteração e degradação dos alimentos e outros que podem provocar doenças de origem alimentar, com maior ou menor gravidade. Estes últimos, por serem causadores de doença, são denominados de patogénicos. Podemos encontrar microrganismos patogénicos um pouco por todo o lado: no ar, na água, no solo, nos alimentos e nas pessoas. Devido às suas reduzidas dimensões passam despercebidos ao ser humano, só sentimos e/ou visualizamos as suas consequências.

5.1. Regras de trabalho em laboratório

Nos habitats naturais, os microrganismos crescem frequentemente em populações mistas mais ou menos complexas, que incluem várias espécies microbianas. Contudo, para



estudar um dado microrganismo, é necessário obter a uma população de células desse microrganismo em cultura pura ou axénica. Assim, o isolamento de um determinado microrganismos a partir de populações mistas, a manutenção e conservação de culturas puras e o crescimento de populações microbianas puras em meios de cultura laboratoriais são técnicas básicas e essenciais em Microbiologia.

Os microrganismos são ubíquos, isto é, estão presentes em todo o lado. Por isso, para obter e manter uma cultura pura é essencial evitar que outros microrganismos (contaminantes) entrem em contacto com ela. Assim, com o objetivo de evitar a ocorrência de contaminações, o microbiólogo recorre a técnicas de assepsia e à esterilização e desinfecção dos materiais que usa no manuseamento das culturas puras de microrganismos. Estas técnicas são críticas no controlo e prevenção do desenvolvimento de microrganismos, quer seja no laboratório quer em processos industriais, nomeadamente nas indústrias alimentar e farmacêutica, ou na prevenção de doenças infecciosas.

Normas Gerais de utilização do Laboratório de Microbiologia

1. O aluno/formando deve procurar familiarizar-se com a localização de extintores de incêndio e chuveiros de emergência. Qualquer acidente deverá ser comunicado imediatamente ao professor/formador responsável.
2. A permanência no laboratório exige postura de estudos e pesquisa, pelo que deve-se observar o silêncio necessário a estas atividades.
3. Aos alunos/formandos exige-se conduta pautada pela seriedade e responsabilidade no trato com os materiais e equipamentos utilizados durante as aulas práticas.
4. Ao entrar no laboratório, o aluno/formando deverá guardar seus pertences num local apropriado e destinado a esse efeito, de modo algum deve levar os seus pertences para a bancada de trabalho, somente pode levar o material necessário para a aula, como manual, caderno e materiais para apontamento. É conveniente desligar aparelhos telefónicos (telemóveis).
5. O uso de bata branca devidamente lavada é obrigatório. O aluno/formando deve vesti-la logo ao chegar ao seu local de trabalho.
6. É proibido fazer experiências não autorizadas pelo professor/formador.



7. O acesso dos alunos ao laboratório de microbiologia só é permitido na companhia de um professor/formador ou técnico de apoio ao laboratório, sempre que não seja nos tempos letivos, e sempre trajando bata branca.
8. Não é permitido o consumo de alimentos e bebidas em qualquer dos espaços do laboratório ou áreas de apoio anexas.
9. É expressamente proibido fumar dentro do laboratório.
10. Não é permitida a presença de alunos, ou de qualquer pessoa sem vínculo com a Instituição, nas dependências do laboratório, sem a presença de um professor responsável ou do técnico de apoio ao laboratório.
11. As aulas práticas regulares têm precedência sobre quaisquer outras atividades.
12. A não observância das exigências com relação às normas de funcionamento implica a proibição de acesso ou o convite para retirada do aluno das dependências do laboratório.
13. No início da aula os alunos devem lavar as mãos com sabão e desinfetante ou desinfetar com álcool iodado a 70%, que deverá estar disponível no laboratório. No final da aula é novamente obrigatória a lavagem das mãos e desinfecção, por motivos de segurança.
14. Após colocar a bata, as pessoas que tenham cabelos compridos, deverão prendê-los por motivo de segurança (uso de fogo).
15. Sobre a bancada de trabalho deve existir um pulverizador com álcool iodado 70%. A área de trabalho deverá ser pulverizada com álcool e limpa com o papel fornecido ou flamejada com o bico de Bunsen (no caso da bancada ser de inox) sempre no início e também ao final de cada sessão de trabalho. Ou seja, SEMPRE, no trabalho em biologia e microbiologia, a PRIMEIRA e a ÚLTIMA coisa a ser feita é a descontaminação da área de trabalho.
16. O aluno encontrará um conjunto de objetos de uso comum. Esses objetos serão usados em diversas ocasiões durante o ano, conforme a necessidade. É dever do aluno verificar a integridade do material recebido e comunicar ao Professor qualquer irregularidade encontrada. De acordo com a orientação do professor/formador, o aluno utilizará os materiais necessários à aula. No final da aula, os materiais removidos serão devolvidos para uso do próximo grupo. Os demais materiais necessários à aula serão colocados sobre a bancada pelo técnico de apoio ao laboratório ou pelo professor.



17. Cada aluno deverá possuir uma caneta capaz de escrever em vidro (caneta de retroprojektor ou específica para vidraria de laboratório).

Normas Específicas a ter nas aulas pelo aluno

1. O aluno deve dedicar atenção especial às condições de trabalho.
2. Antes de iniciar a aula o aluno deve verificar se todos os equipamentos e as suas temperaturas estão a funcionar de forma correta.
3. No início das análises o aluno deve seguir exatamente o protocolo da aula prática considerando o tempo necessário para efetuar todos os procedimentos e obter os resultados. Deve colocar próximo do local de trabalho todo o material a ser utilizado na realização da análise. Deve arrumar cuidadosamente todo antes de iniciar a análise.
4. O aluno deve limpar e desinfetar a superfície de bancadas, balcões e piso antes e depois da aula prática.
5. O aluno deve manipular todo o material de incubação (Culturas em tubos, placas de Petri, Pipetas, etc.) dentro da zona de segurança (câmara de segurança biológica).
6. Todo o material a ser descartado, principalmente os que contenham meios de cultura e microrganismos devem ser colocados tapados dentro de recipientes no local próprio para esta finalidade, para posterior esterilização.
7. Lembre-se que todo material no laboratório de microbiologia deve ser esterilizado previamente, exigindo cuidados especiais no seu manuseio para evitar a contaminação.
8. As colheres, pinças, ansas, espátulas, facas, devem ser desinfetadas com álcool e aquecidas até à incandescência antes e após a sua utilização. Pode-se também mergulhar todo o material em álcool e flamejar, arrefecendo sempre na zona de segurança da chama.
9. Deve ser sempre feita a assepsia do frasco de amostra, antes de iniciar a análise, com algodão embebido em álcool 70%.
10. O aluno deve fazer a assepsia das mãos, antes e depois das análises.
11. O aluno deve manter sempre algodão embebido em álcool 70% num copo de precipitação com uma pinça, durante a repicagem de microrganismo para sua segurança. Este algodão com álcool serve para limpar pequenos derrames. Nunca utilizar as mãos, mas sim a pinça ou luvas descartáveis.



12. O banho-maria deve permanecer com água destilada (limpa) e no nível para não queimar a resistência.
13. É proibido a permanência de pessoas de outras áreas no laboratório de microbiologia, principalmente na sala de inoculação.

Técnicas de Assepsia

As técnicas de assepsia são um conjunto de medidas experimentais simples, mas muito importantes num Laboratório de Microbiologia. Estas técnicas devem ser praticadas durante a manipulação de culturas microbianas e de meios de cultura estéreis, assim como de todo o material de laboratório.

Nomeadamente, um recipiente que contenha uma dada cultura deve ser aberto perto da chama do bico de Bunsen, de forma a impedir uma contaminação devido à entrada de ar exterior contaminado. A transferência de uma porção da cultura contida num tubo ou balão para outro recipiente (**inoculação**) é realizada normalmente com uma ansa (fig. 202) previamente esterilizada pela passagem pela chama do bico de Bunsen (e posteriormente arrefecido) ou através de uma micropipeta com pontas de plástico previamente esterilizadas (em autoclave, por exemplo).

Os procedimentos de assepsia devem sempre ser aplicados em todas as manipulações de material contaminado e nos procedimentos de análise.

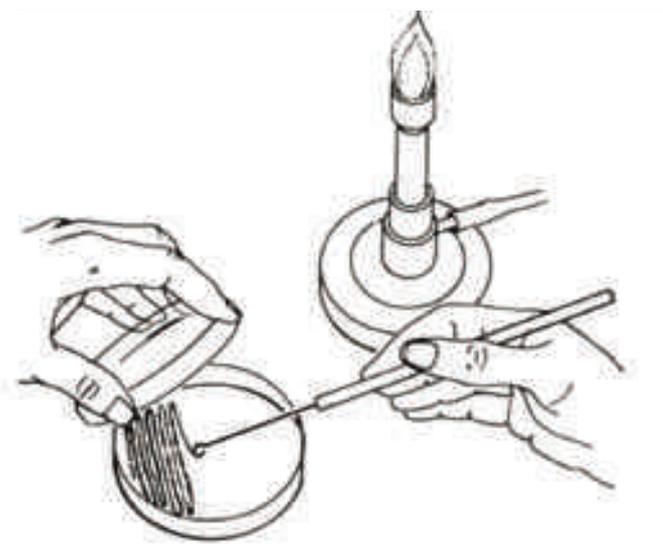


Figura 202 - Técnica de inoculação de uma placa de Petri com meio de cultura sólido, através de uma ansa

A presença de chama do bico de Bunsen é fundamental para criar uma área de trabalho estéril.



Por exemplo, a manutenção de condições de assepsia durante a **inoculação** de um meio de cultura líquido deve seguir os passos seguintes:

1. Passar a ansa pela chama do bico de Bunsen até a extremidade ficar incandescente; deixar arrefecer, ao ar, mantendo a ansa sempre perto da chama;
2. Destapar a placa de Petri que contém a cultura a usar como inóculo, perto da chama;
3. Remover uma porção da cultura com a ansa arrefecida;
4. Destapar o balão contendo o meio de cultura líquido a inocular e passar o gargalo pela chama;
5. Transferir a cultura para o meio de cultura e passar o gargalo do balão novamente pela chama;
6. Esterilizar a ansa, passando-a novamente pela chama até ficar incandescente.
7. Colocar a ansa esterilizada num suporte.

As técnicas de análise, como a anteriormente descrita, serão explicadas conforme vão sendo utilizadas nos procedimentos de análises.

5.2. *Preparação de material*

Em Microbiologia é muito importante que todo o material, bancadas de trabalho e salas de análise estejam devidamente limpos e esterilizados, de modo a evitar a presença de microrganismos contaminantes que possam afetar os resultados das análises. Assim sendo, todos os procedimentos de limpeza e desinfecção/esterilização são muito importantes para a fiabilidade dos resultados e segurança dos analistas.

Lavagem e esterilização de materiais

O material utilizado deve receber a seguinte sequência de tratamento:

- A. **Descontaminação** - todo o material usado (fig. 203) deve ser devidamente descontaminado através da esterilização em autoclave (121°C durante 60 minutos ou 134°C durante 30 minutos), de modo a destruir todas as células vivas. Atenção tubos de ensaio que contenham reagente de KOVAC'S não devem ser autoclavados.





Figura 203 - Placas de Petri contaminadas antes da descontaminação

As lâminas utilizadas em observações microscópicas devem ser imersas em recipientes com hipoclorito de sódio (lixívia) não diluído de forma a destruir as células e microrganismos viáveis que possam estar presentes.

B. Lavagem - depois de descontaminado o material deve ser devidamente lavado com água quente e detergente e enxaguado com água destilada para evitar a formação de resíduos de calcário. Seguindo as etapas:

- Enxaguar o material em água corrente, eliminando material orgânico.
- Utilizar detergente neutro.
- Preparar a solução e mergulhar todo material a ser lavado.
- Deixar de molho por um mínimo 30 minutos ou por até 24 horas dependendo do grau de sujidade.
- Esfregar o material com escova ou esponja.
- Enxaguar o material com bastante água corrente, a última água de enxaguamento deve ser água destilada.

C. Secagem - Depois de lavado, todo o material deve ser seco em estufa a 40 °C (fig. 204) ou a temperatura ambiente. A temperatura de secagem vai variar com o tipo de material.





Figura 204 - Estufa de secagem com ar forçado

D. Preparação dos materiais - Após a secagem cada material deve ser preparado de acordo com o tipo de tratamento que vai receber. Os materiais que recebem tratamento por calor seco podem ser embrulhados em papel Kraft (pardo) ou acondicionados em cilindros apropriados. Todos os materiais devem ser devidamente identificados. As pipetas antes de serem esterilizadas devem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft ou acondicionadas em cilindros apropriados. No caso de tratamento por vapor (autoclave) os materiais devem ser acondicionados dentro de vidros com gaze ou algodão no fundo (ponteiros e bastões), deixando a tampa do vidro ou plástico semiaberta durante o tratamento. Recipientes que contenham pontas de pipetas automáticas podem ser protegidos com papel de alumínio devidamente selado.

E. Esterilização - A esterilização de um qualquer material ou equipamento consiste na destruição ou remoção de todas as formas de vida, patogénicas ou não, a ele associadas. Após o acondicionamento e preparação de todo o material, este pode ser esterilizado por via húmida em autoclave ou por via seca em estufa de esterilização.

Na esterilização em autoclave (fig. 205), todos os tubos e frascos de vidro com tampas de rosca devem ter as suas tampas ligeiramente desapertadas, antes da autoclavagem, de forma a evitar o seu rebentamento. Após a esterilização em autoclave, estas tampas devem ser completamente fechadas de imediato.



Figura 205 - Autoclave



O funcionamento do autoclave deve ser respeitado de acordo com as indicações do fornecedor do equipamento e todas as medidas de segurança devem ser respeitadas.

A esterilização por via húmida (calor húmido) em autoclave causa a desnaturação e coagulação das proteínas das células microbianas, e a água vai influenciar a destruição das membranas e enzimas pois pode induzir a destruição das ligações de hidrogénio, o que torna este processo mais eficaz e diminui o tempo de exposição. A morte das células microbianas ocorre quando as células são sujeitas a temperaturas superiores à temperatura máxima de crescimento dos microrganismos em causa.

A utilização de calor em ambiente húmido (autoclave) é um dos métodos mais eficazes de destruição de microrganismos.

A esterilização por calor húmido é efectuada em autoclave (fig. 205), que consiste numa câmara com vapor de água saturado à pressão de 1 atm acima da pressão atmosférica, a que corresponde, em locais ao nível do mar, uma temperatura de ebulição da água de 121°C. No laboratório de Microbiologia, é usual sujeitar o material a esterilizar a 121°C (1 atm; pressão relativa) durante 15 minutos, de modo a assegurar a morte de todas as formas de vida microbianas, incluindo a dos endósporos bacterianos, mais resistentes ao calor que as células vegetativas. Contudo, o tempo necessário para se esterilizar convenientemente os materiais, a esta temperatura, depende da natureza do material a esterilizar e/ou do seu volume.

O calor húmido sob pressão é utilizado na esterilização de meios de cultura que não contenham componentes termolábeis e na esterilização de material de plástico e de vidro a utilizar nos trabalhos experimentais de Microbiologia.

É também usado na descontaminação de roupas e instrumentos médicos e cirúrgicos, assim como de diversos materiais, reutilizáveis ou descartáveis, contaminados com culturas de células viáveis, antes de serem lavados ou colocados no lixo.

A esterilização por via seca (calor seco) processa-se na ausência de água em estufas de esterilização. Este tipo de esterilização atua sobre os microorganismos provocando a oxidação dos constituintes celulares orgânicos e a desnaturação e coagulação das proteínas. O calor seco penetra nas substâncias de uma forma mais lenta que o calor húmido e por isso exige temperaturas mais elevadas e tempos mais longos, para que haja uma eficaz esterilização. Conforme o calor gerado recomenda-se para 170°C, 60 minutos de exposição; para 120°C é necessário 12 horas de exposição para que a esterilização seja eficaz.



As vantagens de uma esterilização por calor seco são não formar ferrugem nos materiais metálicos, não danifica materiais de corte. É ideal para vidros, metais, algumas gorduras e substâncias em pó. Como desvantagem, o material deve ser resistente a variação da temperatura. E não esteriliza líquidos.

O quadro 9 indica para cada tipo de material qual o tipo de tratamento mais adequado e respectivo tempo e temperatura de esterilização.

Quadro 9 - Tipo de tratamento, temperatura e tempo de esterilização mais adequado para cada material.

MATERIAL	TIPO DE TRATAMENTO	TEMPERATURA / TEMPO
Pipetas embaladas individuais ou em cilindros	CALOR SECO	ESTUFA 120 °C / 30 min.
Placas de Petri, tubos de ensaios, colheres, conchas, frascos, tesouras, etc...	CALOR SECO	ESTUFA 180 °C / 2 h
Frascos para colheitas, filtros, ponteiras, bastões (deixar os frascos com as tampas semiabertas)	CALOR HÚMIDO (VAPOR)	AUTOCLAVE 121 °C / 30 min.
Meios de cultura (maioria)	CALOR HÚMIDO (VAPOR)	AUTOCLAVE 120 °C / 15 min.

No entanto, ainda existem mais dois meios de esterilização que podem ser usados e que possuem aplicações específicas. São a esterilização por filtração e por radiação.

Entre os agentes físicos de esterilização, utilizam-se, principalmente, o calor, a filtração e a radiação (por exemplo, radiação não-ionizante, como a Ultra-Violeta, e radiação ionizante, como os raios X e os raios γ).





Figura 206 - Diferentes métodos físicos de esterilização

A esterilização por filtração (fig. 207) envolve a remoção de células de microrganismos de soluções líquidas ou de gases através da passagem do líquido ou gás por membranas filtrantes. Estas podem ser de vários materiais (mais vulgarmente, acetato de celulose ou de policarbonato) e têm diâmetros de poros muito pequenos (usualmente $0,2 \mu\text{m}$) onde as células microbianas ficam retidas.

Esta técnica é muito utilizada em laboratórios de Microbiologia para esterilizar meios de cultura com componentes que possam sofrer alteração por acção do calor (por ex. vitaminas, antibióticos, açúcares, aminoácidos) e na indústria farmacêutica para esterilização de soluções de vitaminas, de agentes quimioterapêuticos, soro etc..

Contudo, a maior parte dos vírus são suficientemente pequenos para atravessarem os poros destas membranas filtrantes, pelo que esta técnica não assegura a esterilidade total das soluções ou gases filtrados.



Figura 207 - Sistemas de filtração de líquidos

Para além de ser utilizada para esterilizar soluções, a filtração através de membranas filtrantes pode também ser utilizada para concentrar células microbianas a partir de volumes grandes de amostras líquidas, como acontece na análise bacteriológica de



águas; este tipo de filtração utiliza um sistema de sucção através de bomba de vácuo (fig. 208).



Figura 208 - Sistema de filtração e respectiva bomba de vácuo

O ar que circula em **câmaras de fluxo laminar de segurança biológica** (fig. 209) ou em “**salas limpas**” é frequentemente sujeito a filtração através de filtros de elevada eficiência (High Efficiency Particle Air - HEPA- Filter) que permitem a retenção de pelo menos 99,999% das células e esporos microbianos ou outras partículas presentes no ar.



Figura 209 - Câmara de fluxo laminar

A radiação pode ser utilizada na esterilização de superfície e salas de análises, normalmente é utilizada a radiação ultra-violeta, outros tipos de radiação são utilizados a nível farmacêutico.

F. **Armazenamento** - Decorrida a esterilização, o material preparado deve ser guardado em armários e gavetas de modo a estar protegido do pó.



5.3. Preparação de meios de cultura

Os meios de cultura (preparações sólidas, líquidas ou semi-sólidas (fig. 210) que contêm todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos) são utilizados com a finalidade de cultivar e manter microrganismos viáveis no laboratório, sob a forma de culturas puras.

Os meios de cultura devem ter na sua composição, os nutrientes indispensáveis ao crescimento do organismo em questão, sob forma assimilável e em concentração não inibitória do crescimento.



Figura 210 - Meios de cultura sólidos, semi-sólidos e líquidos

Além disso, após a sua preparação, cada meio de cultura deve ser submetido a esterilização, de forma a eliminar qualquer organismo vivo contaminante.

De um ponto de vista geral, os meios de cultura podem ser classificados tendo em conta o seu estado físico, a sua composição química e os objetivos funcionais a que se destinam. A especificidade dos meios de cultura é muito importante, nomeadamente no isolamento e identificação de certos microrganismos (por exemplo, no isolamento de microrganismos do solo) ou em testes de sensibilidade a antibióticos ou na análise microbiológica de águas, de alimentos, etc.

Na preparação de meios de cultura devem seguir-se as indicações constantes dos rótulos das embalagens; pois, cada fabricante tem a sua formulação e define os procedimentos de preparação para cada tipo de meio de cultura.

No entanto, no geral podem considerar-se os seguintes passos na preparação de meios de cultura, uma vez que são comuns a todos:

1. Pesagem do meio de cultura em pó (fig. 210);



2. Diluir em água destilada, no volume correspondente;
3. Se for o caso, levar o meio diluído à fervura, sob agitação constante e tapado;
4. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos;



Figura 211 - Pesagem do meio de cultura em pó

5. Após esterilização, deixar arrefecer o meio até cerca de 50-55°C e deitar, em condições de assepsia (junto à chama do bico de Bunsen), cerca de 10 a 15 ml em cada uma das caixas de Petri previamente esterilizadas, para o caso de se pretender placas para espalhamento em superfície (fig. 212). Deixar solidificar e virar as placas;
6. Caso os meios preparados não sejam imediatamente utilizados, guardar no frigorífico (4°C);



Figura 212 - Preparação de placas de Petri para espalhamento em superfície, em condições de assepsia



5.4. Análises sumárias de pesquisa de alguns microrganismos com importância para a indústria

Na indústria alimentar a realização de análises microbiológicas é muito importante porque permite avaliar as condições de higiene durante a produção, o processamento, o armazenamento e a distribuição dos alimentos. É também importante na determinação do tempo de vida útil do produto alimentar (tempo de prateleira). São várias as análises microbiológicas que podem realizar-se tendo cada uma delas finalidades muito específicas.

Análises Microbiológicas

- **Avaliação da qualidade microbiológica** - Pretende avaliar o risco que os alimentos representam para a saúde humana.
 - **Microrganismos a 30°C**
 - **Bolores e leveduras a 25°C**

Permitem avaliar:

- Condições de higiene
- Potencial deterioração do produto alimentar
- Tempo e temperatura de conservação
- Eficácia do tratamento
- Tempo de vida útil do produto

- **Microrganismos indicadores** - Como o próprio nome indica as análises destes microrganismos indicam a origem da contaminação, podendo revelar más práticas de fabrico dos alimentos.
 - **Bactérias coliformes** - grupo de bactérias latose positivas. Presentes no intestino do homem, animais de sangue quente, solo e plantas. Indicador de contaminação de origem fecal.
 - **Enterobacteriaceae** - família de bactérias na qual se encontram os géneros *E.Coli*, *Salmonella*, *Shigella*. Estas bactérias são eliminadas por tratamento térmico correto e a ações de limpeza de desinfeção eficazes. Bom indicador de avaliação das condições de qualidade sanitária dos



alimentos processados. Em alimentos submetidos a tratamento térmico, a sua presença está associada a tratamento inadequado ou a contaminações posteriores.

- ***Escherichia coli*** - indicador de contaminação fecal em águas e alimentos. Indicador clássico da provável presença de microrganismos patogénicos entéricos. A sua presença em níveis elevados está associada à presença de *Salmonella* e/ou estirpes patogénicas (por ex. *Escherichia coli* O:157)

- **Microrganismos potencialmente patogénicos**

- ***Staphylococcus aureus*** - indicador de higiene pessoal. A sua presença está associada a toxinfecções alimentares e à produção de enterotoxinas. Este microrganismo está presente em 25 a 40% da população saudável. Encontra-se associado a produtos sujeitos a manipulação frequente (carne, leite, ovos e derivados).
- ***Clostridium perfringens*** - anaeróbio restrito. Formas esporuladas e vegetativas, não se desenvolvem a temperaturas inferiores a 12-15°C. Possível indicador de contaminação fecal.
- ***Bacillus cereus*** - comum no solo e vegetação. Quando está presente em número elevado é patogénico devido à libertação de toxinas. Indicador de higiene em produtos que tenham sido submetidos a tratamento térmico. Principais fontes de contaminação são o arroz, cereais, carnes e vegetais.

- **Microrganismos patogénicos**

- ***Samonella spp*** - a maioria das espécies é patogénica para o homem. Representa um dos principais problemas de saúde pública (Por ex. nos EUA anualmente responsável por 1,4 milhões de infecções; 580 mortes; custo de 3 biliões de dólares. Fonte: OMS). Indicadora de más práticas de higiene. Eliminada se forem cumpridas boas práticas de higiene e fabrico. Principais fontes são carnes, leite, ovos, sumos de frutas, bolos com cremes.
- ***Listeria monocytogenes*** - resistentes a várias condições ambientais (por ex. sal e acidez), podem ser eliminadas após tratamento térmico



adequado. Alimentos não refrigerados e mantidos em refrigeração durante tempo prolongado aumentam o risco do seu desenvolvimento. Transmissão através de contaminação posterior de alimentos processados com alimentos crus. Indicadora de más práticas de fabrico. Principais fontes de contaminação são queijos de pasta mole, produtos cárneos, leite e derivados, saladas.

A análise microbiológica (fig. 213) em si divide-se em várias etapas que devem ser seguidas e respeitadas para que os resultados das análises realizadas sejam válidos.

Figura 213 - Análise microbiológica deve respeitar várias etapas



Etapas dos Métodos de ensaio microbiológicos:

- Colheita de amostras
- Receção da amostra
- Pesagem e preparação da suspensão-mãe
- Sementeira
- Incubação
- Contagem e confirmação
- Leitura e cálculo dos resultados

A análise microbiológica constitui uma ferramenta fundamental para a avaliação e garantia da segurança alimentar, pelo que as etapas anteriormente referidas vão ser devidamente explicadas ao longo das atividades práticas propostas ao longo dos módulos da disciplina de transformação. Estas aulas práticas de microbiologia devem ser realizadas em espaço próprio - o laboratório de microbiologia - devido aos cuidados necessários que são fundamentais para a segurança dos alunos/formandos e dos professores/formadores. A figura 214 retrata um exemplo de um laboratório de microbiologia para aulas.





Figura 214 - Laboratório de Microbiologia

Microscópio

Uma vez que o microscópio é um equipamento fundamental num laboratório de microbiologia é importante fazer referência ao seu funcionamento e cuidados de utilização. Os séculos XVII e XVIII foram testemunhas de passos fundamentais na Microbiologia. Foi nesse período que o Homem começou a aperceber-se da existência de células, descobrindo, por exemplo, que o sangue é formado por uma infinidade de “corpúsculos” e que “as plantas são (...) uma massa infinita de pequenas células ou vesículas”.

A partir do século XIX, a célula começou a ser vista como uma entidade perfeitamente organizada e viva, passando a ser considerada a unidade básica estrutural e funcional dos seres vivos.

Estes e outros progressos no conhecimento dos fenómenos da vida devem-se ao desenvolvimento de um fantástico instrumento de pesquisa - o **microscópio** (fig. 215). Este, aperfeiçoado ao nível da técnica moderna, constitui, ainda hoje, um dos mais importantes meios para o estudo da vida.

Os microscópios são instrumentos que permitem obter imagens ampliadas, podendo aumentar de cem a centenas de milhares de vezes o tamanho original das amostras observadas.



Figura 215 - Microscópio ótico



Sem os microscópios, a teoria celular provavelmente nunca teria sido formulada, e o conhecimento sobre o mundo dos microrganismos seria muito limitado. Dependendo da ampliação, os microscópios dividem-se em dois tipos distintos: microscópio ótico que utiliza a radiação luminosa, por fótons para a transmissão da imagem, e o microscópio eletrônico, que utiliza um feixe de elétrons para o mesmo efeito.

Os microscópios óticos possuem lentes óticas, existindo cinco variedades: microscópio luminoso, de campo escuro, de ultravioletas, de fluorescência e de contraste de fase.

O microscópio ótico de campo luminoso é o mais vulgarmente utilizado.

A) Constituição do microscópio ótico composto (M. O. C.)

No microscópio ótico composto (Fig. 216) distinguem-se duas partes:

- parte mecânica
- parte ótica

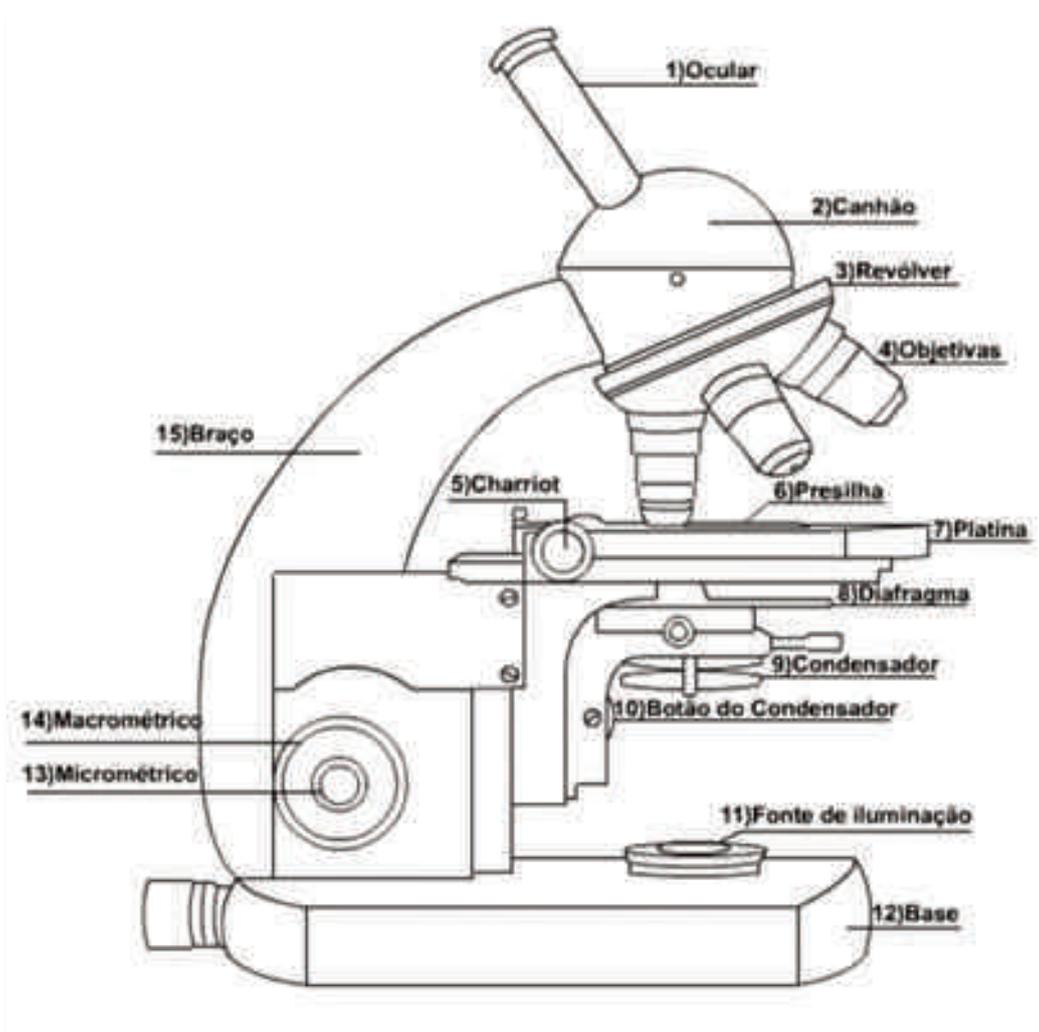


Figura 216 - Representação esquemática de um Microscópio Ótico Composto



Parte Mecânica ou Sistema mecânico

Divide-se em duas partes:

Sistema de suporte

- **Base ou pé** - Parte pesada que assenta sobre a mesa de trabalho, permitindo a estabilidade de todas as outras peças.
- **Coluna ou braço** - Peça fixa à base, na qual estão aplicadas todas as outras partes constituintes do microscópio.
- **Platina** - Peça paralela à base, onde se coloca a preparação a observar. No centro apresenta uma abertura - a janela - por onde passam os raios luminosos.
- **Pinças** - Fixam o objeto à platina.
- **Revólver ou Porta-objetivas** - Peça giratória portadora das várias objetivas. Ao imprimir-lhe um movimento circular, coloca-se cada uma das objetivas no prolongamento do tubo.
- **Canhão ou Tubo** - Peça onde se situa o sistema de ampliação. A extremidade superior comporta a ocular e a parte inferior, o revólver ou porta-objetivas.

Sistema de focagem

- **Parafuso macrométrico** - Dispositivo que possibilita movimentos verticais de grande amplitude, os quais provocam a aproximação ou o afastamento entre a platina e as objetivas, proporcionando uma focagem rápida.
- **Parafuso micrométrico** - Funciona como o parafuso macrométrico proporcionando, no entanto, movimentos verticais de pequena amplitude que levam a uma focagem mais perfeita.

Parte Ótica ou Sistema ótico

Sistema de ampliação

- **Lente Ocular** - Sistema de lentes, situado na parte superior do tubo, que amplia a imagem fornecida pela objetiva, funcionando como uma lupa. Em cada ocular está assinalado o seu poder de ampliação.
- **Lentes Objetivas** - Cada objetiva consiste num sistema de lentes que projeta uma imagem ampliada do objeto em direção à ocular.



Sistema de Iluminação

- **Fonte de Luz** - Nos microscópios mais antigos, de iluminação indireta, existe um espelho móvel em todas as direções, que recebe a luz e a envia para o condensador. O espelho apresenta duas faces distintas: uma face de superfície plana, que se usa apenas com luz natural (não se deve utilizar a luz solar direta) e uma face de superfície côncava, que se utiliza quando recorremos a uma fonte de luz artificial.
- **Condensador** - Sistema constituído por duas ou três lentes, cuja finalidade é concentrar os raios emitidos pela fonte luminosa, fazendo-os incidir na preparação.
- **Diafragma** - Dispositivo que se encontra associado ao condensador e que se destina a regular a intensidade luminosa.

A figura 217 mostra-nos como o sistema de iluminação é importante na ampliação da espécie a ser observada.

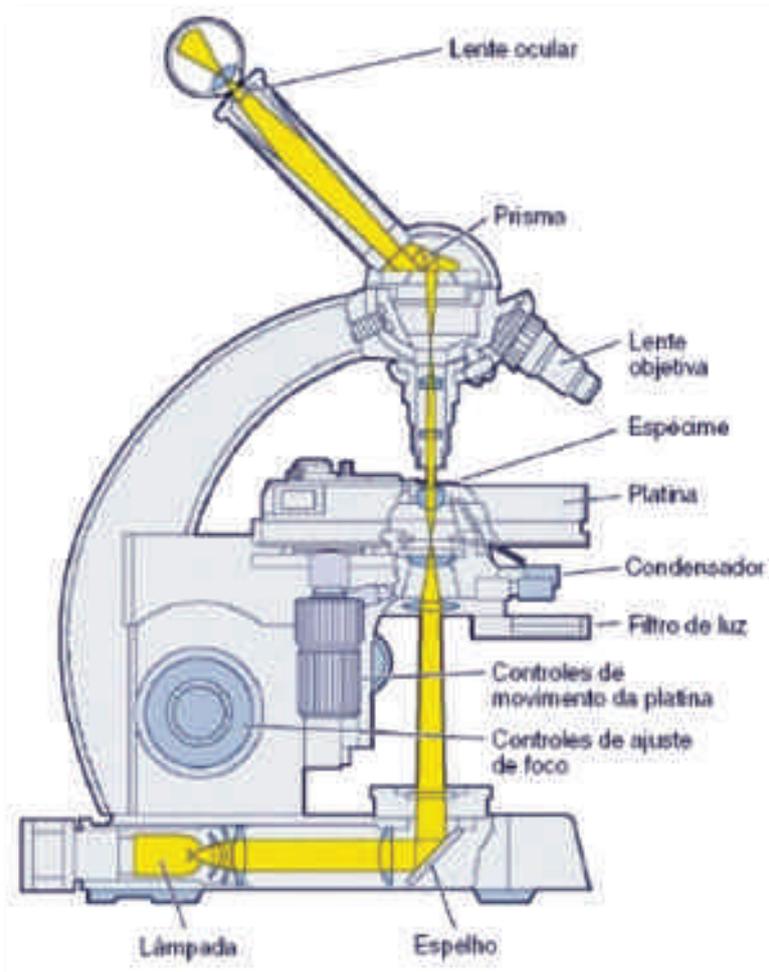


Figura 217 - Esquema do processo de iluminação no interior do microscópio



Ampliação

A ampliação total da imagem, vista ao microscópio ótico, é dada pelo produto da ampliação da objetiva pela ampliação da ocular.

Assim, por exemplo, se a ampliação da objetiva for de 40x e a ampliação da ocular de 10x, a ampliação total é de 400x. Ou seja, a imagem é ampliada 400x.

Geralmente a ampliação máxima, neste tipo de microscópio é de 1000x.

O tamanho dos microrganismos é normalmente expresso em micrómetros ($\mu\text{m}=0,000001\text{m}$) e nanómetros ($\text{nm}=0,000000001\text{m}$). A bactéria *Escherichia coli*, por exemplo, tem cerca de 1,5 μm de comprimento.

B) O microscópio eletrônico

O microscópio eletrônico é um microscópio que não utiliza a luz, mas sim feixes de elétrons. Este tipo de microscópio permite um aumento da imagem muito superior aos microscópios convencionais (cerca de 500.000x comparando com as 1000x dos microscópios óticos).

Neste tipo de microscópio não há lentes de cristal mas sim bobinas, chamadas de lentes eletromagnéticas. Estas lentes ampliam a imagem criada, projetando-a numa tela, onde é formada uma imagem semelhante à de uma televisão a preto e branco.

Existem três tipos de microscópio eletrônico: o de transmissão (fig. 218), que é utilizado para a observação de cortes muito finos; o de varrimento (fig. 219), capaz de produzir imagens de alta ampliação para a observação de superfícies; e



o de tunelamento (fig. 220) para a visualização de átomos.



Figura 218 - Microscópio eletrônico de transmissão

Figura 219 - Microscópio eletrônico de varrimento, ampliações elevadas até 300000 vezes

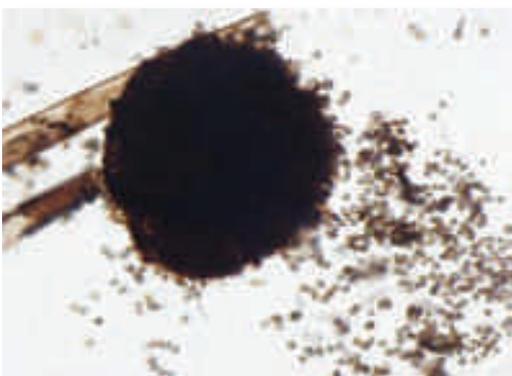




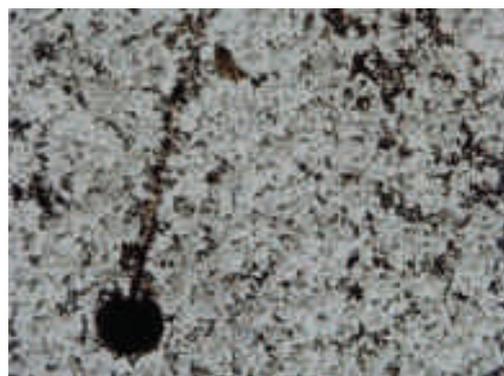
Figura 220 - Microscópio eletrônico de tunelamento

As fotografias seguintes foram tiradas a diferentes tipos de microrganismos em microscópio ótico:

Fungos (fig.s 221 e 222)



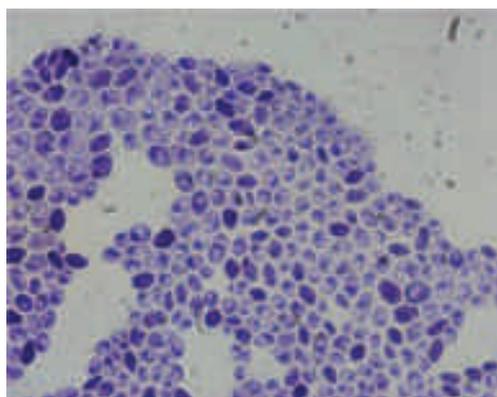
*Figura 221 - Fotografia do fungo *Aspergillus niger* tirada ao microscópio óptico. Representa a libertação de esporos. (ampliação 400x)*

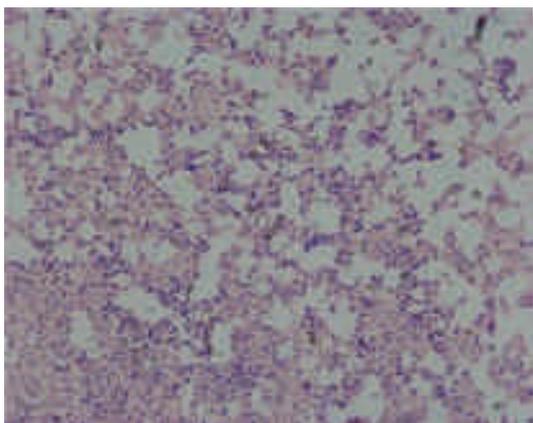


*Figura 222 - Fotografia do fungo *Aspergillus niger* tirada ao microscópio óptico (ampliação 100x)*

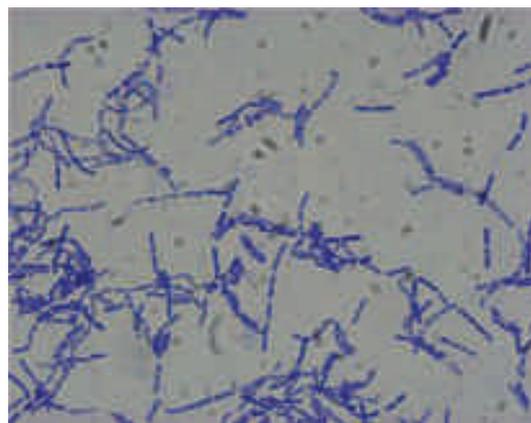
Leveduras (fig. 223)

*Figura 223 - Fotografia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tirada ao microscópio óptico (ampliação 1000x)*

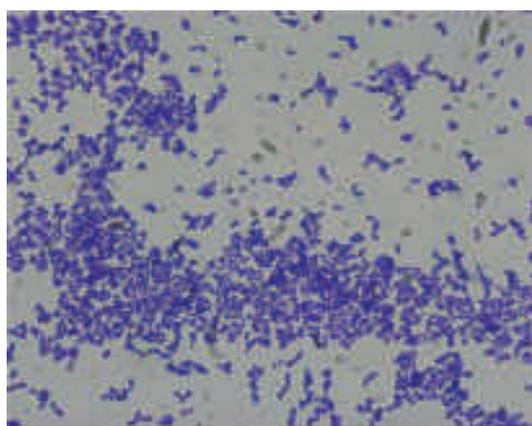


Bactérias (fig. 224 a 226)

*Figura 224 - Fotografia da bactéria
Escherichia coli tirada ao microscópio
óptico
(ampliação 1000x)*



*Figura 225 - Fotografia da bactéria
Bacillus cereus tirada ao microscópio
óptico
(ampliação 1000x)*



*Figura 226 - Fotografia da bactéria Staphylococcus aureus tirada ao microscópio óptico
(Ampliação 1000x)*

C) Microscopia Óptica - Princípios Básicos**1. Cuidados a ter com o Microscópio**

Uma vez que o microscópio é um aparelho frágil e caro, é necessário ter alguns cuidados na sua manipulação:

- Quando não estiver a ser utilizado, o microscópio deve estar na sua caixa ou no armário e resguardado com uma capa de plástico, de modo a protegê-lo da humidade, poeiras e da exposição solar;



- O microscópio deve ser **sempre** transportado com as duas mãos (uma colocada por baixo da base e a outra segurando o braço);
- **Nunca** arraste o microscópio;
- O microscópio não deve ser colocado perto do bordo da mesa de trabalho;
- Evite molhar a platina do microscópio quando executar preparações a fresco, nas quais utilize água ou qualquer outro líquido como meio de montagem;
- Preste especial atenção à focagem, para que a objetiva não toque no objeto, evitando a danificação da mesma e a destruição da preparação;
- Não tocar com os dedos nas lentes do microscópio;
- Usar papel adequado para a limpeza, nomeadamente lenços de papel ou papel de cozinha;
- As lentes não devem tocar nas lâminas;
- Quando terminar o trabalho com o microscópio, coloque a objetiva de menor ampliação e retire a preparação da platina;
- Certifique-se de que a platina e as lentes ficam limpas.

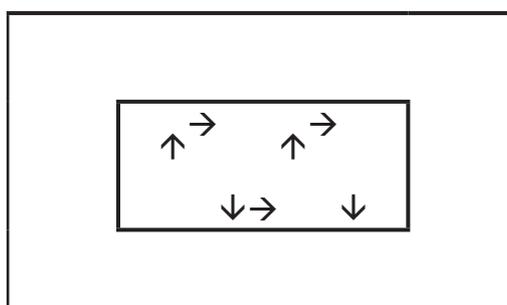
2. Regras para a observação ao microscópio

1. Sente-se de modo a manter uma posição correta, colocando o microscópio um pouco à sua esquerda.
2. O caderno ou a folha de notas e desenhos deve ficar à sua direita, encostado à base do microscópio.
3. Coloque a preparação a observar na platina do microscópio, tendo o cuidado de a fixar com as pinças. Certifique-se de que a lamela está sobre a lâmina.
4. Rode o revólver de modo a colocar a objetiva de menor ampliação.
5. Antes de iniciar qualquer observação, é necessário proceder à iluminação do campo do microscópio. Para tal, certifique-se de que o diafragma está aberto e o condensador completamente subido. Depois, se o microscópio tiver uma fonte de iluminação própria, ligue-a; se não tiver, oriente o espelho em busca de uma boa iluminação.
6. Observe, pela ocular, com o olho esquerdo, mantendo o direito aberto. Com a mão esquerda, efetue os movimentos de focagem, quer os de focagem rápida (com o parafuso macrométrico), quer os de focagem lenta (com o parafuso



micrométrico). A mão direita deve efetuar os movimentos da preparação sobre a platina.

7. Procure obter uma imagem nítida, movendo o parafuso macrométrico. Não deve conseguir uma focagem perfeita. Para tornar a imagem nítida, rode o parafuso micrométrico num e noutro sentido.
8. Para ampliar a imagem obtida, deve rodar o revólver, colocando no alinhamento do tubo a objetiva seguinte (ouvir-se-á um estalido). Para ajustar a focagem, basta rodar o parafuso micrométrico.
9. Regule a iluminação, ajustando convenientemente a posição do diafragma e do condensador (uma objetiva de maior ampliação exige uma maior abertura do diafragma).
10. Para observar metodicamente uma preparação, proceda do seguinte modo:
 - Foque a preparação;
 - Com a objetiva de menor ampliação, percorra a preparação de acordo com o seguinte esquema:



- Se encontrar algum pormenor que lhe pareça importante, foque-o com muito cuidado para que o possa estudar.
 - Para obter uma maior ampliação do objeto a observar, coloque uma objetiva de maior ampliação e corrija a focagem, utilizando apenas o parafuso micrométrico.
11. Ao finalizar a sua observação proceda do seguinte modo:
 - Baixe a platina do microscópio com o parafuso macrométrico;
 - Abra o diafragma;



- Certifique-se de que a platina e as lentes das objetivas e da ocular ficam limpas;
- Coloque a objetiva de menor ampliação;
- Coloque o microscópio na respectiva caixa ou tape-o e guarde-o no armário.



Atividades – Exercícios

1. O trabalho prático em laboratório exige cuidados específicos que o aluno deve ter.

Quais as normas específicas a ter nas aulas práticas pelo aluno?

2. No trabalho em microbiologia as técnicas de assepsia são de extrema importância. Porquê?

3. A esterilização de material é fundamental. Explique porquê.

4. Os ensaios microbiológicos devem respeitar várias etapas.

Quais são as etapas a cumprir durante os métodos de ensaio microbiológicos?

5. O microscópio ótico composto é um instrumento muito importante na observação de microrganismos.

Quais as partes constituintes deste equipamento?

6. O microscópio proporciona a ampliação da imagem.

Como é determinada a ampliação?

7. Uma vez que o microscópio é um aparelho frágil e caro, é necessário ter alguns cuidados na sua manipulação.

Indique os cuidados a ter com este equipamento.



ATIVIDADES - PRÁTICAS

Atividade Prática n.º 1 - Estudo das características da imagem em microscopia ótica

Material

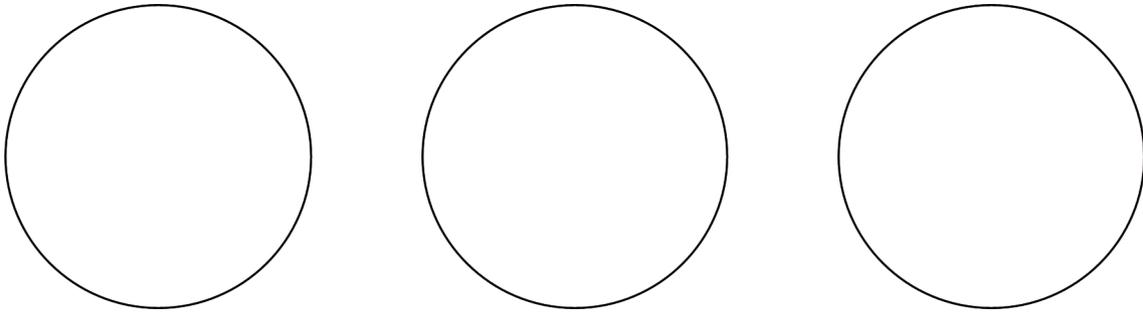
- Microscópio ótico composto
- Pinça
- Tesoura
- Agulha de dissecação
- Conta-gotas
- Lâminas e lamelas
- Tiras de papel de filtro
- Papel de jornal ou de revista
- Papel de limpeza
- 2 cabelos / fios de cores diferentes

Modo de Proceder

1. Coloque uma gota de água sobre a lâmina
2. Recorte, de um pedaço de papel de jornal, a letra A ou a letra F (maiúsculas)
3. Coloque a letra sobre uma gota de água e deixe “ensopar” o papel.
4. Coloque a lamela de modo a formar um ângulo de 45° com a lâmina e, com a ajuda da agulha de dissecação, deixe-a cair lentamente de modo a evitar a formação de bolhas de ar.
5. Observe ao microscópio com a objetiva de menor ampliação.
6. Faça um esquema da letra tal como a observa à vista desarmada na preparação e desenhe também a imagem observada ao microscópio.
7. Desloque a preparação na platina, para a direita e para a esquerda, para a frente e para trás, e registre os sentidos de deslocação da imagem.
8. Coloque a objetiva de ampliação imediatamente a seguir (10x).



9. Faça um esquema do que observa. Utilizando os círculos para registro das observações no seu caderno de laboratório. Deve sempre registrar tudo o que observa e indicar em cada observação registrada a ampliação utilizada.



10. Coloque a objetiva de 40x e esquematize o que observar.
11. Faça uma preparação com dois pedaços de cabelos / fios de cores diferentes cruzados, usando como meio de montagem uma gota de água.
12. Com a objetiva de menor ampliação, observe a zona de cruzamento dos cabelos / fios.
13. Faça pequenos movimentos com o parafuso micrométrico e registre o que observou.
14. Repita o procedimento anterior utilizando objetivas de maior ampliação.



Atividade Prática nº 2 - Observação de células do epitélio lingual

Objetivo: Fazer preparações microscópicas de células e descrever os constituintes observados.

Material

- Microscópio ótico composto
- Caixa de palitos
- Conta-gotas
- Lâminas e lamelas
- Agulha de dissecação
- Azul de metileno
- Soro fisiológico

Procedimento:

1. Lave a boca, bochechando com água.
2. Coloque no centro de uma lâmina uma gota de uma solução de azul de metileno.
3. Com um palito, raspe levemente a superfície dorsal da língua ou parede lateral (fig. 1), colocando o produto obtido sobre a gota de corante.
4. Coloque a lamela sobre a preparação, tendo em atenção a técnica de colocação da lamela descrita na montagem de preparações.
5. Examine ao microscópio com média ampliação e depois mude para grande ampliação. Desenhe o que observar e legende.

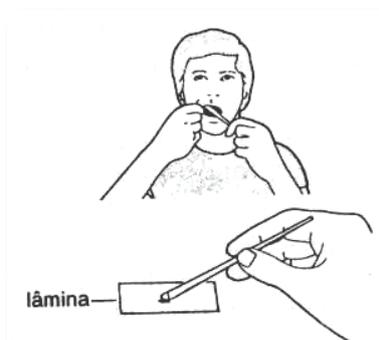


Figura 1 - Colheita de amostra de células do epitélio lingual



Montagem de preparações

1. Deite uma gota de água ou de outro meio de montagem no centro de uma lâmina de vidro.
2. Coloque o objeto a observar sobre a gota de água ou reagente.
3. Encoste a lamela, obliquamente à lâmina, de modo a fazer um ângulo de 45°.
4. Deixe cair, lentamente, a lamela (de preferência apoiada a uma agulha de dissecação).
5. Retire o excesso de água ou reagente, com papel de filtro.
6. Faça uma pequena pressão para eliminar as bolhas de ar que possam ter ficado.
7. Observe ao microscópio.

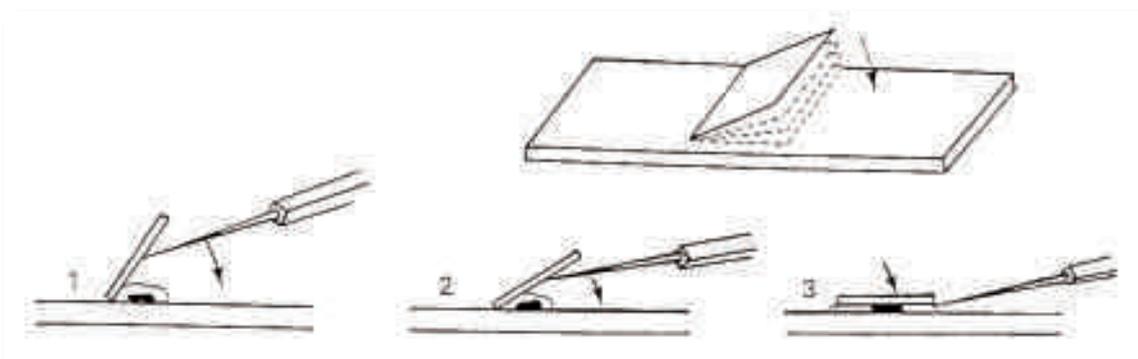


Figura 2 - Fases da montagem de uma preparação

Discussão: Compare as células observadas com as representadas na figura 3.



Figura 3 - Células do epitélio lingual



Atividade Prática nº 3 - Observação de células vegetais

Toda a diversidade dos seres vivos existentes na Terra (biodiversidade) é constituída pela mesma unidade básica - a **célula**. Seja bactéria, um bicho-da-seda, uma flor, uma ave ou mesmo um ser humano, as formas vivas, das mais simples às mais complexas, são constituídas por células.

A maior parte das células não pode ser vista a olho nu, havendo necessidade do uso do microscópio para a sua observação.

Material:

- Microscópio
- Lâminas e lamelas
- Vidros de relógio
- Bisturi
- Pinça
- Tesoura
- Conta-gotas
- Palito
- Cebola
- Corantes: soluto de Lugol e azul de metileno

Procedimento:

1. Coloque uma gota de soluto de Lugol no centro de uma lâmina.
2. Destaque um pequeno fragmento da face interna da epiderme da cebola (Figura 1).



Figura 1 - Epiderme da cebola

3. Coloque esse fragmento sobre a gota de soluto de Lugol (de modo a que a face que estava sobre o tecido carnudo fique em contacto com a lâmina).



4. Coloque a lamela sobre a preparação.
5. Observe ao microscópio e desenhe o que observar, legendado.
6. Compare com a Figura 2.

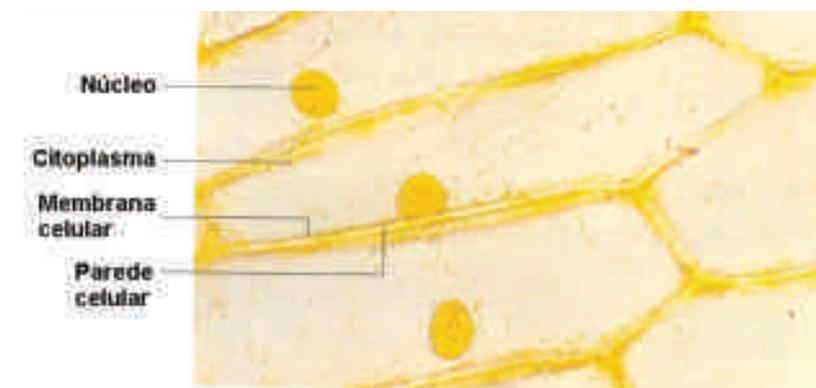


Figura 2 - Células da epiderme interna da cebola

Discussão

1. Com base nos dados, justifique a designação de organismo multicelular que se aplica a alguns dos seres vivos que conhece.
2. Mencione uma característica de uma célula de uma planta que não está presente numa célula animal.
3. Considere as observações de células animais realizada na atividade prática n° 2 e indique duas características comuns, nas células vegetais e animais observadas.



Atividade Prática nº 4 - Observação microscópica de protozoários

Existem alguns seres vivos que são constituídos por uma única célula. Estes seres vivos denominam-se unicelulares e pertencem ao reino protista. Também são chamados de protozoários (fig. 1).

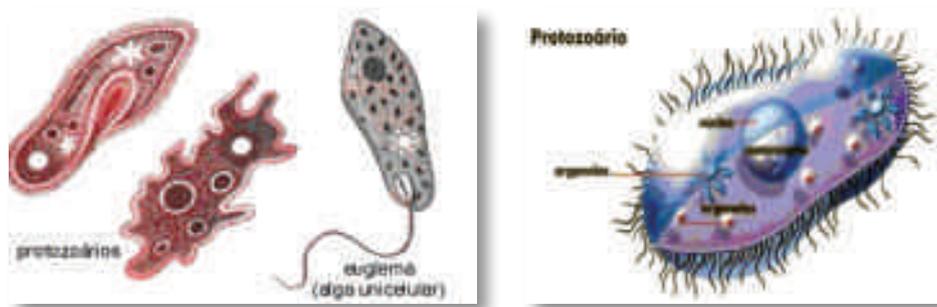


Figura 1 - Protozoários

Material

- Conta-gotas
- Microscópio ótico
- Láminas e lamelas
- Papel de limpeza
- Papel de filtro
- Água iodada

Amostra

Infusão preparada com água de charcos e folhas de diversas plantas ou só água de charco, água do mar ou rios.

Procedimento

1. Com o conta-gotas retira uma gota da amostra e coloca-a no centro da lâmina.
2. De seguida, com o auxílio de uma agulha de dissecação, colocou-se a lamela por cima do preparado de maneira a não ficarem bolhas de ar.
3. Prepare o microscópio e observe a amostra com diferentes ampliações. Registe e legende as observações.



4. Se quiser observar melhor os seres vivos, poderá colocar uma gota de água iodada e papel de filtro numa das preparações anteriormente utilizadas.

Discussão

1. Considere os esquemas que elaborou a partir das observações e tente identificá-los utilizando os recursos fornecidos neste manual.



Atividade Prática nº 5 - Observação microscópica de bolores

O bolor na laranja é formado por fungos que se alimentam da laranja. Os fungos lançam uma espécie de suco digestivo que vai transformando os materiais de que ela é feita em açúcares, água, sais minerais, e outros nutrientes. Essa decomposição gera o apodrecimento da laranja.

Material:

- Microscópio
- Lâminas
- Lamelas
- Conta-gotas
- Bisturi

Amostra:

- Laranja com bolor ou outra fruta com bolor

Procedimento 1:

1. Com o auxílio do bisturi retire um pouco do bolor existente na laranja e coloque-o sobre uma lâmina.
2. Coloque uma gota de água sobre a preparação.
3. Cubra a preparação com uma lamela e observe-a atentamente ao microscópio.
4. Com auxílio da informação fornecida por este manual identifique os constituintes do fungo que está a observar.
5. Elabore um esquema da observação realizada e faça a sua legenda.

Procedimento 2:

Preparações grosseiras com fita adesiva

1 - Preparações grosseiras para exame rápido podem ser obtidas estendendo-se sobre a superfície do fungo um pedaço de fita adesiva (fita cola). A fita é removida cuidadosamente e colada à lâmina, sendo dispensada a utilização de lamela. Deste modo evita-se que os esporos se espalhem pelo laboratório.



2 - Procede-se à observação ao microscópio e regista-se as observações.

Nota: Na observação de bolores é muito útil observá-los através de uma lupa eletrónica, principalmente na observação de colónias formadas.



Atividade Prática nº 6 - Observação microscópica de leveduras

As leveduras são organismos do domínio dos eucariontes, reino dos fungos. São estirpes da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que medeiam a produção de pão, de vinho e de cerveja. Esta espécie geralmente obtém energia por fermentação alcoólica, produzindo etanol, embora também tenha capacidade para respirar aerobiamente.

Parte I - Observação Microscópica

Material

- Porção de fermento de padeiro fresco
- Água destilada
- Lâminas e lamelas
- Conta-gotas
- Microscópio

Procedimento

1. Suspender cerca de 0,25g de fermento de padeiro em 10ml de água.
2. Retirar uma gota da suspensão de células e colocar sobre uma lâmina; cobrir com a lamela.
3. Observar ao microscópio, começando pela objetiva de menor ampliação. Registrar e legendar as observações realizadas.

Parte II - Preparação de meio de cultura para leveduras em placas de meio sólido

Procedimento:

1. Deitar 100 ml de água para um balão.
2. Adicionar 2 a 4 g de mel.
3. Adicionar 2 g de agar.
4. Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C e 1 atmosfera para esterilizar.
5. Deitar cerca de 10 mL do meio preparado para caixas de Petri esterilizadas junto à chama (Fig. 1), e deixar arrefecer. As placas podem ser de vidro e devem



ter sido antes esterilizadas e embrulhadas em papel Kraft. Ou então pode-se utilizar placas de Petri descartáveis que vêm já esterilizadas.



Figura 1 - Verter meio de cultura em placas de Petri esterilizadas

Parte III - Isolamento de leveduras

Material

- Porção de fermento fresco
- Água esterilizada
- Placas com meio sólido
- Ansa
- Tubo de ensaio estéril

Procedimento:

(Trabalhar junto à chama)

1. Suspender um pedaço muito pequeno de fermento em 5ml de água esterilizada contida num tubo de ensaio.
2. Esterilizar a ansa à chama.
3. Arrefecer a ansa no interior do tubo sem tocar na suspensão.
4. Mergulhar a ansa na suspensão e fazer uma placa de isolamento no meio sólido contido na placa, num extremo da placa começar a fazer um zig-zag com a ansa.
5. Colocar as placas a 25°C ou à temperatura ambiente.
6. Após 5 dias de incubação observar as colónias. Registe as observações relativas às características das colónias.



Parte IV - Observação microscópica a partir de colónias isoladas

1. Retirar, junto à chama, com uma ansa de repicagem, uma porção pequenina de células duma colónia isolada duma placa de isolamento (fig. 2).
2. Depositar estas células numa gota de água, colocada sobre uma lâmina (fig. 3). Cobrir com uma lamela.
3. Observar ao microscópio ótico.

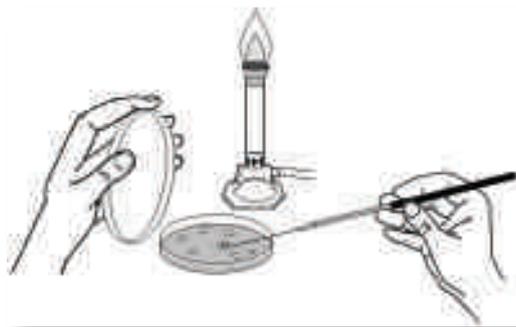


Figura 2 - Retirar com uma ansa de repicagem, um pequeno fragmento de uma colónia de levedura

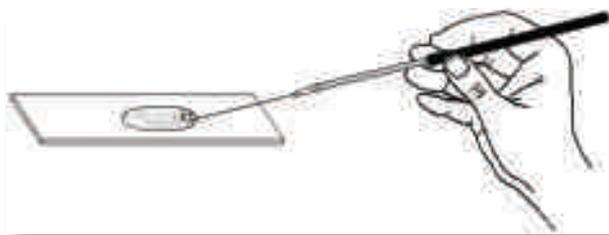


Figura 3 - Depositar o fragmento de colónia numa gota de água sobre uma lâmina e colocar a lamela



Atividade Prática nº 7 - Observação microscópica das bactérias do iogurte

As bactérias do iogurte medeiam a transformação do leite em iogurte. Utilizam a lactose como fonte de carbono e de energia, levando a cabo uma fermentação láctica, como principal processo gerador de energia. São bactérias Gram positivas de baixo conteúdo G+C. Os iogurtes devem conter quantidades aproximadamente iguais de *Streptococcus* e de *Lactobacillus*.

Parte I - Observação microscópica de bactérias do iogurte

Material

- Iogurte magro natural
- Ansa
- Lâminas
- Lamelas
- Microscópio ótico

Procedimento:

1. Mergulhar a ansa no iogurte.
2. Fazer um esfregaço fino numa lâmina limpa.
3. Observar ao microscópio, começando pela objetiva de menor ampliação.
4. Tentar distinguir os dois tipos de bactérias lácticas.

Notas

Pode fazer-se o mesmo com o soro do iogurte, que embora possua muito menos bactérias, não tem tanta gordura.

Pode corar-se com uma gota de mercurocromo, que se espalha na altura de fazer o esfregaço.



Parte II - Preparação de meio de cultura em placas para bactérias do iogurte

Material

- Balões de Erlenmeyer de 0,5 l
- Extrato de levedura
- Lactose
- Peptona
- Agar
- Panela de pressão ou autoclave
- Caixas de Petri, previamente esterilizadas

Procedimento:

1. Verter 100ml de água para um balão.
2. Adicionar 0,5g de extrato de levedura.
3. Adicionar 0,5g de peptona.
4. Adicionar 0,5g de lactose.
5. Adicionar 1,5g de agar.
6. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C (1 atmosfera).
7. Verter para caixas de Petri, junto à chama e deixar arrefecer. As placas ficam feitas e prontas a usar quando o meio tiver solidificado.

Parte III - Isolamento de bactérias do iogurte

Material

- Iogurte magro natural
- Ansa
- Placas com meio sólido
- Parafilme ou película aderente
- Chama
- Estufa a 37°C.

Procedimento:

1. Abrir o iogurte perto da chama.



2. Esterilizar a ansa à chama (deixar ir ao rubro). Deixar arrefecer e mergulhar no soro do iogurte.
3. Fazer um riscado numa placa contendo meio sólido.
4. Selar a placa com tiras de parafilme ou película aderente.
5. Colocar na estufa a 37°C. Após 2 dias tentar observar os 2 tipos de colónias:
 - a. Colónias muito transparentes em forma de flor (Lactobacillus)
 - b. Colónias brancas, pequenas e redondas (Streptococcus)
6. Retirar, junto à chama, uma porção de células dum tipo de colónia isolada, com uma ansa.
7. Depositar essas células numa gota de água, colocada sobre uma lâmina. Cobrir com lamela. Observar ao microscópio, tentando identificar os microrganismos.
8. Repetir o procedimento do ponto 7 para o outro tipo de colónia.
9. Retirar, com uma ansa junto à chama, uma porção de células dum tipo de colónia isolada. Fazer uma placa de isolamento. Colocar na estufa a 37°C.
10. Fazer para os dois tipos de colónias, com vista a obter-se um crescimento isolado dos dois géneros de microrganismos.



Atividade Prática n° 8 - Observação microscópica de bactérias - Coloração de Gram

A observação de microrganismos reveste-se de dificuldades não só devido à sua reduzida dimensão mas, também, porque estes são transparentes e praticamente incolores. Com o propósito de estudar as suas propriedades e/ou de diferenciar os microrganismos em grupos específicos para fins taxonómicos e de diagnóstico, recorre-se normalmente a técnicas de coloração.

A coloração de Gram, desenvolvida em 1884 pelo médico dinamarquês Christian Gram, é um dos métodos de coloração mais aplicados em Bacteriologia. Trata-se de um método de coloração diferencial, dado que permite dividir as bactérias em duas classes - Gram negativas e Gram positivas. É pois uma ferramenta essencial na classificação e diferenciação de bactérias.

Esta diferenciação baseia-se na diferente estrutura e composição, nomeadamente no diferente teor lipídico, da parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas. A parede celular das bactérias Gram negativas tem um teor em lípidos elevado na sua membrana externa, para além de uma camada fina de peptidoglicano que circunda a membrana plasmática. Em consequência, durante o passo de diferenciação pelo álcool, parte dos lípidos são dissolvidas pelo álcool, formando-se poros na parede por onde o corante primário (violeta de cristal) sai das células. Estas células ficam transparentes após o passo de diferenciação pelo álcool, sendo posteriormente coradas com o corante secundário (safranina).

A parede celular das bactérias Gram positivas é constituída principalmente por uma camada grossa de peptidoglicano e o seu teor em lípidos é nulo ou muito baixo (em poucas espécies bacterianas). A camada de peptidoglicano atua, assim, como uma barreira impedindo a saída do corante primário e estas células ficam coradas de violeta escuro.

Proposta de trabalho experimental

Coloração de Gram e observação microscópica das células de bactérias presentes num iogurte (cultura mista das bactérias *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*).



Material:

- Lâminas e lamelas
- Ansas
- Pinça
- Vareta de vidro
- Copo de precipitação
- Corantes - soluções de violeta de cristal e de safranina
- Xilol
- Álcool etílico a 95% (v/v) e a 90 %
- Lugol
- Solvente orgânico de etanol-acetona 1:1 (v/v)

Coloração de Gram das bactérias do iogurte**Procedimento:**

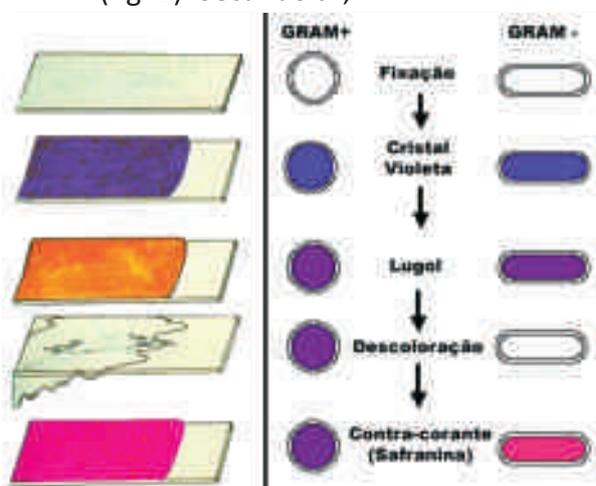
1. Homogeneizar o iogurte com uma vareta;
2. Preparar um esfregaço, espalhando uma gota de iogurte homogeneizado sobre uma lâmina de vidro previamente desengordurada com xilol (fig. 1). Secar ao ar;
3. Desengordurar o esfregaço, cobrindo-o com xilol durante 1 minuto. Secar ao ar;
4. Fixar o esfregaço desengordurado, cobrindo-o com álcool etílico a 95% (v/v), durante 5 minutos (fig. 2). Secar ao ar;



Figura 1 - Passo 2



Figura 2 - Passo 4



5. Corar a preparação pelo método de Gram (fig. 3):

Figura 3 - Método de coloração Gram



6. Cobrir o esfregaço da cultura em estudo (previamente fixado à lâmina de vidro) com uma solução de violeta de cristal (VC). Deixar atuar durante 1 minuto (fig. 4). Após este passo, todas as células ficam coradas com o violeta de cristal (corante primário).



Figura 4 - Passo 6

7. Lavar com esguicho de água destilada (fig.5);



Figura 5 - Passo 7

8. Secar com papel de filtro, sem esfregar. Cobrir a preparação com reagente de Lugol e deixar atuar durante 1 minuto (fig. 6).



Figura 6 - Passo 8

9. Escorrer a solução de Lugol, lavar com água e secar. O iodo da solução de Lugol forma um complexo insolúvel com o corante primário. O complexo violeta de cristal-iodo (VC-I) tem uma cor mais intensa (violeta escuro) do que o VC livre e é mais difícil de remover das células.



10. Diferenciar pelo álcool a 90°, deixando cair a solução de álcool gota a gota sobre a preparação até que não saia mais corante, ou com o solvente orgânico de etanol-acetona, 10-20 segundos (fig. 7). Este é o passo de diferenciação entre bactérias Gram negativas e Gram positivas. As primeiras perdem o complexo VC-I e as últimas retêm-no. As células de bactérias Gram positivas ficam, pois, coradas de violeta-escuro e as Gram negativas ficam incolores.



Figura 7 - Passo 10

11. Lavar com água, escorrer e secar com papel de filtro.

12. Tornar a corar a preparação, durante 5 minutos, com uma solução de safranina. As células incolores de bactérias Gram negativas ficam coradas de cor-de-rosa (cor do contra-corante safranina).



Figura 8 - Passo 12

13. Escorrer o corante, lavar com água e secar com papel de filtro (fig. 9).



Figura 9 - Passo 13



14. Observar no microscópio ótico de campo claro (fig. 10), com a objetiva de imersão (x 100), não esquecendo colocar uma gota de óleo de imersão entre a preparação e a objetiva.



Figura 10 - Passo 14

Discussão:

Bactérias lácticas do iogurte (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*)

1. Gram Positiva?
2. Gram Negativa?



Atividade Prática nº 9 - Observação microscópica de halobactérias

As halobactérias são contaminantes habituais do bacalhau seco salgado. Crescem à sua superfície, como manchas avermelhadas, e exalam um cheiro característico a bacalhau podre, mesmo quando o bacalhau está em perfeitas condições de utilização. Para o isolamento destes organismos, põe-se num meio líquido (como o descrito abaixo, omitindo o agar) uma pequena lasca de bacalhau (preferencialmente, se já estiver com cheiro intenso e manchas) e incuba-se a uma temperatura de 37-50°C, durante 1-4 semanas. Um boião de vidro é um ótimo recipiente. Quando o meio de cultura ficar com cor vermelha e o cheiro conhecido a bacalhau estragado, pode proceder-se ao isolamento das bactérias em placas. As halobactérias do género *Halobacterium* são cilíndricas e têm movimento por flagelos; as do género *Halococcus* são esféricas.

Parte I - Observação microscópica de halobactérias

Material

- Bacalhau ou outro peixe salgado que apresente zonas vermelhas e cheiro intenso.
- Tubo de ensaio
- Água destilada
- Sal
- Ansa de repicagem
- Lâminas e lamelas
- Microscópio ótico

Procedimento:

1. Retirar ou raspar um pedaço pequeno de bacalhau numa zona que esteja vermelha.
2. Colocar num tubo de ensaio contendo 1 a 2ml de solução salina de NaCl (20%).
3. Agitar bem.
4. Mergulhar a ansa na solução.



5. Colocar uma gota numa lâmina limpa. Colocar lamela.
6. Observar ao microscópio, começando pela objetiva de menor ampliação.

Parte II - Meio de cultura em placas para halobactérias

Material

- Bacalhau
- Panela
- Copos de precipitação
- Proveta
- Funil
- Papel de filtro
- Sal
- Medidor de pH
- NaOH (soda cáustica)
- Agar
- Caixas de Petri
- Placa de aquecimento

Procedimento:

1. Cozer 200 g de bacalhau em 0,5 L de água durante 30 minutos.
2. Filtrar a água de cozedura através de papel de filtro.
3. Verter o líquido para um copo de precipitação. Deixar arrefecer.
4. Por cada 100 mL juntar 20 g de sal. Retirar o sal em excesso que não se dissolveu.
5. Acertar a pH 7 com NaOH com ajuda do medidor de pH.
6. Adicionar 2 g de agar por cada 100 mL.
7. Aquecer a solução até entrar em ebulição.
8. Retirar a espuma em excesso, verter para caixas de Petri, e deixar arrefecer.

Parte III - Isolamento de halobactérias

Material:

- Bacalhau que apresente zonas vermelhas e cheiro intenso



- Ansa de repicagem
- Placas com meio de cultura sólido
- Parafilme ou película aderente
- Chama
- Estufa a 40°C

Procedimento:

1. Esfregar um pedaço de bacalhau numa zona que esteja vermelha numa placa com meio de cultura sólido.
2. Selar a placa com tiras de parafilme ou película aderente.
3. Colocar na estufa a 40°C. Passados 2 a 3 dias, identificar as colónias vermelhas, e fazer placas de isolamento a partir de colónias isoladas.
4. Colocar na estufa a 40°C. Passados 2 a 3 dias voltar a observar.
5. Registrar o formato das colónias e as observações microscópicas.



CULTIVO DE MICRORGANISMOS EM LABORATÓRIO - Documento de Apoio às aulas práticas

1. Inoculação e Isolamento

1.1. INOCULAÇÃO

Semear ou inocular significa introduzir artificialmente uma quantidade de amostra (inóculo) num meio de cultura adequado, com a finalidade de iniciar uma cultura microbiana. Após a inoculação, o meio de cultura é incubado a uma temperatura adequada para o crescimento.

A inoculação pode ser realizada em meio líquido, sólido ou semi-sólido, utilizando-se uma ansa ou pipeta estéril.

Cultivo em meio líquido

Habitualmente realiza-se em tubos ou em frascos de laboratório (Erlenmeyers, por ex.). O crescimento da população microbiana é evidenciado pela turvação do meio, por formação de película ou por formação de sedimento (fig.1).



Figura 1 - Tubo à direita, meio BHI sem sementeira; tubo à esquerda, meio BHI após crescimento bacteriano. Observar turvação indicativa de multiplicação microbiana

Cultivo em meio sólido

Pode ser conduzido em tubos ou em placas.

a) Tubos com ágar inclinado para inoculação, move-se suavemente a ponta da ansa sobre a superfície do ágar com um movimento em zig-zag do fundo até à parte superior, com cuidado para não danificar (ferir) a superfície do meio.



b) Tubos com ágar não inclinado, inocula-se introduzindo a ponta de uma ansa em agulha no centro do meio (tipo picada).

c) Inoculação em placas de Petri, pode ser em superfície ou em profundidade.

A inoculação em superfície pode ser realizada de duas formas:

- 1) Adiciona-se 1 mL de uma diluição da amostra com pipeta estéril no centro da placa e espalha-se com o auxílio de espalhador de vidro estéril.
- 2) Inocula-se com a ansa de platina em anel, conforme será explicado mais adiante em técnica de sementeira.

Inoculação em profundidade: Adiciona-se 1 mL da amostra ou uma das suas diluições no centro de uma placa de Petri vazia esterilizada. Verter sobre o inóculo 10 ml de meio de cultura fundido e aquecido a 45°C. Agitar a placa realizando movimentos circulares no sentido horário e no sentido anti-horário ou realizando movimentos em oito, suavemente para que o líquido não saia da placa.

Incubar as placas na posição invertida, após arrefecimento do agar, uma vez que a elevada concentração de água no meio pode provocar condensação durante a incubação.

No meio sólido, cada célula viável dará origem a uma colónia, portanto a inoculação em placas pode ser utilizada, não somente para cultivar microrganismos, como também para contar e isolar colónias. Em geral quando se deseja obter colónias isoladas a partir de um determinado material, é necessário diluir a amostra em tubos com água destilada estéril ou em soluto de Ringer.

TÉCNICA DE SEMENTEIRA

Alguns procedimentos são indispensáveis para deteção e quantificação de diferentes microrganismos. Estas técnicas consistem em regras de assepsia e segurança para evitar a contaminação dos meios de cultura com microrganismos do ambiente; para obter culturas puras; para evitar acidentes laboratoriais.

1. A ansa de platina deve ser flamejada antes e depois de qualquer operação de sementeira. Para tanto, devem ser aquecidos ao rubro e a parte inferior do cabo



- deve ser passada na chama de 2 a 3 vezes. A posição correta para flamejar a ansa é que a mesma faça um ângulo de 45° em relação à mesa de trabalho.
2. Antes de retirar o material para a elaboração do esfregaço ou para sementeira deve-se arrefecer a ansa na parede interna do tubo ou na tampa da placa de Petri.
 3. Para a sementeira em tubos de ensaio, deve-se flamejar rapidamente a boca dos mesmos logo **após a retirar a tampa de algodão ou de plástico**. Esta deverá ser mantida segura pelo dedo mínimo da mão que está segurando a ansa. Após a retirada do material com a ansa, flamejar novamente a boca do tubo e recolocar a tampa. Flambar a ansa após o uso. **Não pousar os tampões sobre a bancada.**
 4. As pipetas utilizadas em Microbiologia são previamente embrulhadas em papel e esterilizadas. Para uso, torcer o papel na região central da pipeta, retirar primeiramente o papel na parte superior e depois a inferior (correspondente à ponta da pipeta). Esta sequência evita que a pipeta seja contaminada pelas mãos do operador. Uma vez usada, a pipeta deve ser colocada dentro de uma proveta de vidro ou plástico, contendo desinfetante. No caso das pontas esterilizadas de micropipetas, as pontas devem ser colocadas em recipiente com desinfetante.
 5. As placas de Petri deverão ser abertas próximas ao bico de Bunsen para evitar contaminação com microrganismos do ar. Uma vez semeadas as placas devem ser incubadas em estufas com tampa voltada para baixo.

Técnica de sementeira em placa de Petri a partir de cultura de bactéria.

Procedimento (fig. 2 e 3):

- a.) flamejar a ansa;
- b.) remover o tampão de algodão ou tampa;
- c.) introduzir a ansa na cultura de bactérias;



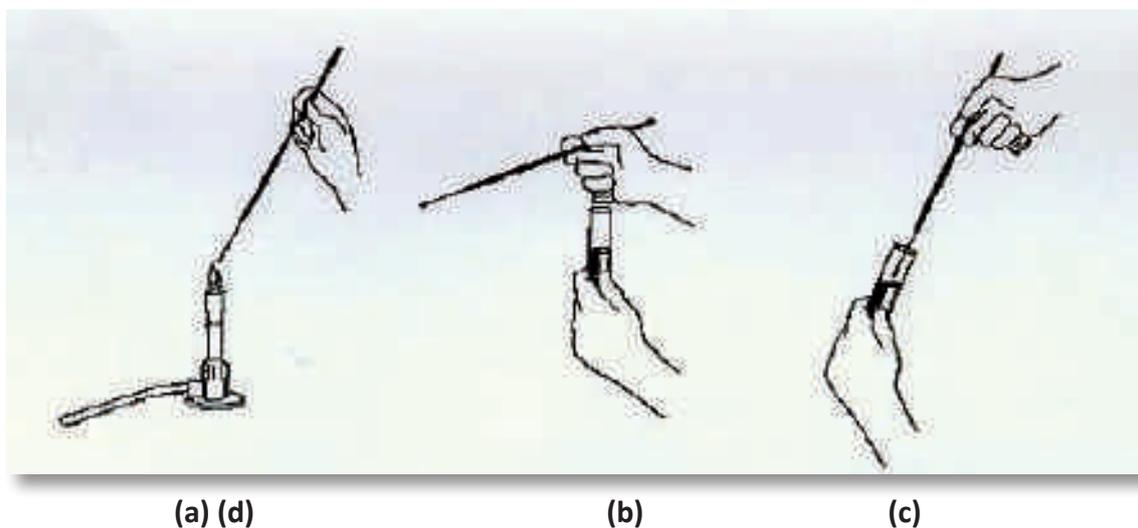


Figura 2 - Processo de recolha de amostra

- d.) com a ansa, delicadamente, semear na placa de Petri;
- e.) flamejar novamente a ansa;
- f.) a partir de um ponto já semeado, distribuir o material na placa, fazendo estrias na restante área da placa.

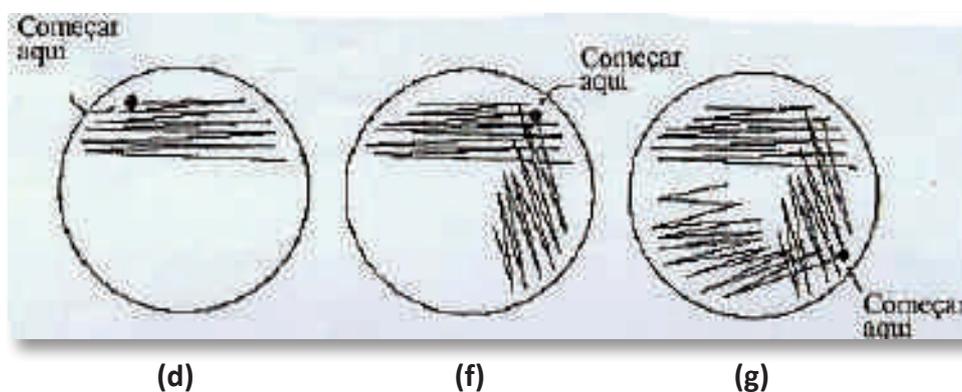


Figura 3 - Técnica de sementeira

1.2. ISOLAMENTO

Isolar significa separar um tipo de microrganismo a partir de uma população que o contém. Em habitats naturais, raramente encontramos os microrganismos em culturas puras (um único tipo de microrganismo), portanto é necessário um procedimento de isolamento para separar e identificar os distintos tipos de microrganismos presentes.



O isolamento pode ser feito diretamente a partir de uma amostra quando os microrganismos estão numa proporção adequada. Quando o microrganismo que se deseja isolar encontra-se em pequena quantidade, é realizado o procedimento chamado enriquecimento que significa elevar a quantidade dos microrganismos de interesse com relação ao restante da população. A seguir isola-se empregando o método de isolamento por estrias ou por diluição, para posterior identificação.

Procedimentos empregados no isolamento de microrganismos:

- a) isolamento por estrias
- b) isolamento por diluição

Isolamento em placas por estrias

Existem diversas técnicas, todas com o objetivo de obter colónias isoladas.

Técnica A

Consiste em retirar com a ansa de platina em anel a amostra e fazer estrias paralelas na quarta parte da superfície da placa; flamejar a ansa, arrefecer, girar a placa 90° e continuar a fazer estrias cobrindo outro quarto da placa, após tocar 3 ou 4 vezes a área semeada inicialmente. Por último, sem flamejar novamente, fazer estrias no restante da superfície da placa (fig. 4).

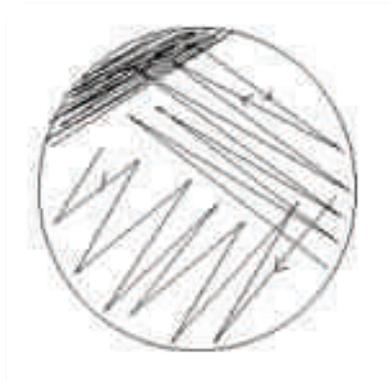


Figura 4 - Técnica das estrias

Técnica B

Com a ansa de platina carregada fazer 3 ou 4 estrias; flamejar e fazer mais 3 ou 4 estrias perpendiculares às anteriores, flamar novamente e repetir o procedimento até esgotar a superfície da placa (fig. 5).

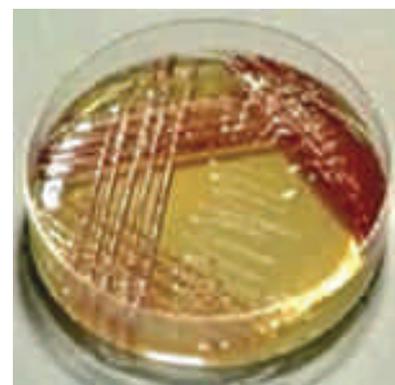


Figura 5 - Técnica das estrias cruzadas



Isolamento por diluição em meio sólido

Para este procedimento, é usado tanto o método de inoculação em profundidade como o método de inoculação em superfície. Apenas é necessária a diluição da amostra. Portanto pode-se preparar diluições decimais utilizando-se água estéril ou outro diluente. A inoculação em profundidade pode ser realizada tal como foi descrita anteriormente. Uma outra forma é preparar as diluições diretamente em tubos de ágar fundido e aquecido (20 mL), agitar por rotação do tubo entre as mãos e verter o meio em placas de Petri estéreis.

CULTURA PURA

Uma cultura pura pode ser observada a partir de colónias isoladas em meio não seletivo, através de um exame microscópico que deve apresentar células morfológicamente semelhantes e com o mesmo resultado para a coloração de Gram. Para facilitar a identificação, deve-se descrever as colónias macroscopicamente em função do tamanho, forma, borda, elevação, transparência e cor (fig. 6). Quando são obtidas colónias isoladas em meios seletivos, deve-se proceder a um novo isolamento em meio não seletivo utilizando-se o método de estrias. Este procedimento é conhecido como re-isolamento.

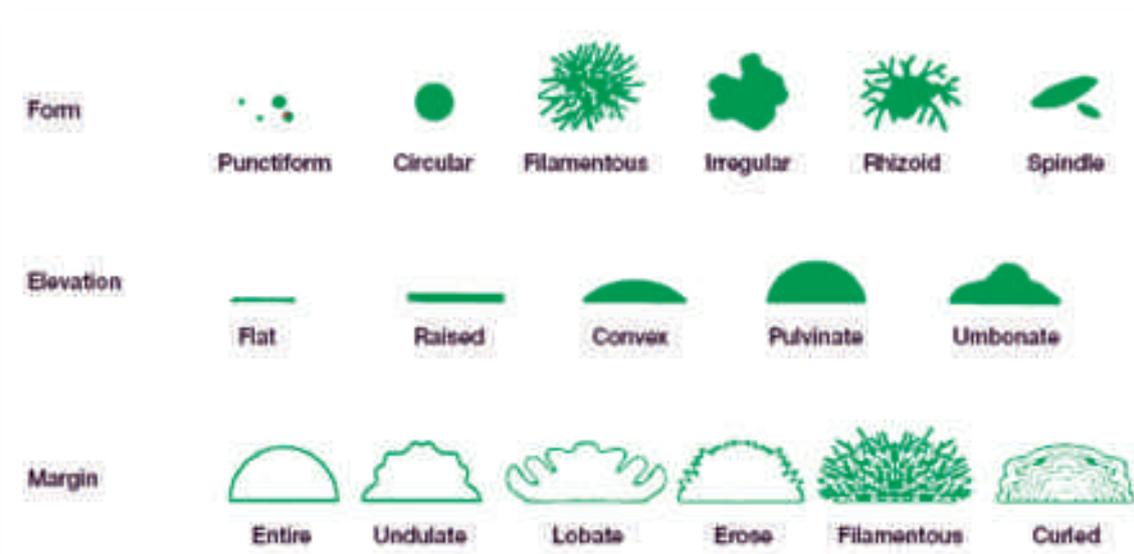


Figura 6 - Colónias formatos, elevação e contornos



PESQUISA DE MICRORGANISMOS:

Quando se deseja saber se um determinado tipo de microrganismo está presente ou ausente numa amostra, deve-se realizar as seguintes etapas:

- a) enriquecimento
- b) isolamento por estrias em meios de cultura seletivos ou diferenciais.
- c) re-isolamento (meio de cultura não seletivo)
- d) identificação

A etapa de enriquecimento pode subdividir-se em duas: pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo.

O *pré-enriquecimento ou enriquecimento não seletivo* deve ser realizado somente quando os microrganismos estão debilitados ou sofreram danos, sendo empregados apenas meios nutrientes líquidos, não seletivos.

O *enriquecimento seletivo* é realizado incubando-se a amostra em meios líquidos seletivos, ou seja, em presença de agentes químicos ou biológicos que favorecem o desenvolvimento em particular dos microrganismos pesquisados.

Uma vez cumprida a etapa de enriquecimento, procede-se ao isolamento, empregando a técnica de estrias em superfície, utilizando-se meios de cultura seletivos e diferenciais.

O re-isolamento em meios não seletivos, para obtenção de culturas puras e identificação das mesmas, é a etapa final. O resultado da pesquisa dá-se sempre expressando PRESENÇA ou AUSÊNCIA por grama ou ml de amostra inoculada na primeira etapa do procedimento (enriquecimento).

Atenção:

- **Não esquecer que o trabalho em microbiologia ocorre sempre na presença de uma chama, devendo-se trabalhar o mais próximo desta.**
- **Todo o material deve estar esterilizado antes de usar.**
- **Todo o material contaminado tem de ser descontaminado.**
- **Lavar e desinfetar as mãos antes e após a realização de análises microbiológicas ou sempre que se manipule material incubado.**



GLOSSÁRIO DE MICRORGANISMOS

Anisakis simplex

Os parasitas que pertencem à ordem *Ascaridida* fazem parte de um grupo cuja sintomatologia é designada por síndrome da larva migrans visceral. Os hospedeiros definitivos são mamíferos marinhos com vários hospedeiros intermediários. Entre estes os primeiros são pequenos crustáceos que fazem parte da base da cadeia alimentar de animais marinhos. A ingestão, em cadeia, dos pequenos pelos maiores torna infetantes muitos elos desta cadeia alimentar, acabando, alguns deles, por chegar aos hospedeiros definitivos.

A infecção do homem ocorre quando ingere peixes que contêm a forma larvar infetante. Esta pode penetrar parcialmente na parede de estômago ou intestino e produzir granuloma eosinofílico.

A sintomatologia que ocorre entre 4-6 horas após a ingestão do peixe contaminado, nas formas mais severas, tem um quadro de gastroenterite com epigastralgias, náuseas, vômitos, febre e diarreia com sangue nas fezes, podendo haver sintomatologia tipo apendicite e o parasita causar perfuração intestinal; podem surgir reações anafiláticas/ alérgicas rápidas que podem levar à morte.

Muitas infecções humanas apresentam sinais abdominais ou outros, sugestivos de obstrução intestinal, podendo o parasita ser retirado da garganta ou eliminado pela tosse.

O consumo de peixe cru ou insuficientemente cozinhado, em vinagrete, fumado ou marinado têm estado na origem desta infecção. Cavala crua, sushi e sashimi têm sido responsáveis pela doença. O salmão, cavala, arenque, bacalhau, pescada, atum, palmeta e esperlano (espécie de salmonete) são veículos da larva do parasita. A importação de outros hábitos alimentares nomeadamente orientais, nórdicos e a nossa tradição alimentar, o consumo de sardinha assada, do peixe fresco grelhado, marinado constituem um risco potencial para a infecção por este parasita.

Bacillus cereus

As bactérias pertencentes ao género *Bacillus* compreendem um grande número de espécies, estando relatadas, até ao momento, 48 espécies diferentes. As bactérias deste



gênero caracterizam-se por uma intensa atividade metabólica, já que produzem enzimas que degradam muitos substratos orgânicos. Devido a esta característica, a identificação deste microrganismo é bastante complicada.

Esta espécie apresenta células em forma de bastonetes, móveis, esporulados, Gram positivos e anaeróbios facultativos, mesófilo com flagelos peritríquios, e produtor de esporos que podem ser centrais ou subterminais. São catalase positivos e oxidase variáveis. Produz tanto uma enterotoxina, como uma exotoxina, dependendo da estirpe. A enterotoxina é de natureza proteica, termolábil, podendo ser destruída a uma temperatura de 60° C durante 20 minutos, enquanto a exotoxina é de natureza peptídica, termorresistente, exigindo temperaturas elevadas para a sua destruição, cerca de 126° C durante 90 minutos.

O *Bacillus cereus* é uma bactéria saprófita do solo e tem sido isolado de uma grande variedade de alimentos especialmente de origem vegetal (cereais), mas também de água, carne, peixe e produtos lácteos.

Característica da Doença

O *Bacillus cereus* pode causar muitas infecções e intoxicações: para além das infecções de origem alimentar pode causar septicémica, meningite, gangrenas, abscesso pulmonar, endocardite, infecções oculares e morte infantil.

As toxinfecções alimentares provocadas por esta bactéria estão principalmente associadas à conservação de alimentos cozinhados em condições que permitem o seu crescimento e a sua multiplicação. As toxinfecções provocadas por este microrganismo devem-se a duas enterotoxinas produzidas pela sua forma vegetativa: enterotoxinas emética e diarreica.

A **doença emética** caracteriza-se por um curto período de incubação que varia de 1 a 5 horas, e seus principais sintomas são náuseas, vômitos e cólicas abdominais. Esta forma da doença está quase que exclusivamente associada a alimentos farináceos, contendo cereais, principalmente arroz (cozido e sobretudo aquecido), mas também a molhos, chouriços, sopas, assados no forno, massas e saladas.

A **doença diarreica** é caracterizada por um período de incubação de 8 a 16 horas e os sintomas incluem dor e cólicas abdominais e diarreia aquosa. Está associada ao consumo de leite, sandes de carne, puré de batata, carnes picadas ou cortadas, alimentos com milho.



Brucella

Este género é constituído por pequenos cocobacilos de 0,4 a 0,6 por 1,5 micrómetros, imóveis, não esporulados, Gram negativos e aeróbios.

A brucelose é uma infeção causada por algumas espécies bacterianas do género *Brucella*. Existem seis espécies que causam doença humana e cada uma tem uma origem específica: *Brucella melitensis* em cabras e carneiros, *Brucella abortus* em bovinos, *Brucella suis* em suínos, *Brucella canis* em cães e *Brucella pinnipedialis* em animais marinhos.

As três espécies deste género com capacidade de produzir doença no Homem e animais são a *B. abortus* (bovinos), a *B. melitensis* (caprinos) e a *B. suis* (suínos). Quaisquer destas três espécies tem capacidade de infetar o Homem, a transmissão ocorre através do contato com animais infetados e tecidos de animais contaminados ou através da ingestão de produtos contaminados, como por exemplo, ingestão de leite e/ou laticínios (queijos frescos) provenientes de animais infetados, originando a conhecida febre de Malta.

Caraterísticas da Doença

Nos humanos o período de incubação é normalmente 3 a 21 dias, podendo chegar aos 7 meses. O início dos sintomas pode ser repentino ou gradual; na forma aguda os sintomas predominantes são pirexia, suores, calafrios, fraqueza, mal-estar, dores no corpo, perda de peso e anorexia; na forma crónica (mais de 1 ano) há registo de febre recorrente, dores no corpo, dores de cabeça, suores, depressão recorrente, inércia, impotência sexual e insónia. A doença pode ser incapacitante, levando à invalidez permanente. Podem ocorrer infeções graves do sistema nervoso central ou endocardites.

Campylobacter

A campilobacteriose em humanos é uma infeção bacteriana causada por *Campylobacter spp.* (termofílico). Tipicamente a dose infetante é baixa (pode ser 500 células) e as espécies mais associadas com infeção em humanos são *Campylobacter jejuni* seguido pela *Campylobacter coli* e *P Campylobacter lari*, embora outras espécies possam também causar infeções.

Destaca-se, neste género, a espécie *C. jejuni*, como responsável por enterites agudas, numa escala comparável às provocadas pelas salmonelas. Esta espécie apresenta



bastonetes espiralados, não esporulados, móveis por um único flagelo polar, Gram negativos e microaerófilos. Possui como habitats preferenciais o trato intestinal e oral de animais, como aves, ovinos, cães e gatos. As infecções alimentares associadas a esta espécie têm ocorrido pela ingestão de produtos láteos crus, animais de capoeira crus ou mal cozinhados, e água de consumo.

Caraterísticas da Doença

O período de incubação em humanos varia entre 2 a 5 dias. Os sintomas podem ser moderados a graves, sendo comum diarreia aquosa ou viscosa contendo sangue e/ou leucócitos fecais, dores abdominais e musculares, febre, dor de cabeça e náuseas. Normalmente a infecção é auto limitada e dura poucos dias, 7 a 10, após a ingestão dos alimentos.

Campylobacter é uma bactéria facilmente destruída pela desidratação e reparação culinária representando um risco só quando os alimentos são preparados em más condições de higiene ou consumidos sem serem bem cozinhados.

Clostridium botulinum

Clostridium botulinum é uma bactéria ubiqüitária produtora de uma toxina poderosa. Esta espécie bacteriana apresenta as suas células em forma de bastonetes com 0,5 a 0,8 por 3 a 8 micrómetros, dispostos isoladamente, ou aos pares ou em cadeia, móveis por meio de flagelos peritríquios, produtora de esporos, são bacilos Gram-positivos pertencente à família Bacillacea e anaeróbios estritos. Os esporos são ovais, o esporângio é dilatado e geralmente subterminal.

O *Clostridium botulinum* é responsável pela doença conhecida pelo botulismo, intoxicação alimentar grave e, eventualmente, fatal, que afeta o Homem causando perturbações neuromusculares. Esta espécie produz potentes toxinas, de natureza proteica, de elevado peso molecular e termorresistentes. Estas toxinas apenas são destruídas pelo aquecimento a 80° C, durante 30 minutos ou a 100° C, durante 10 minutos. Conhecem-se sete toxinas botulínicas diferentes, classificadas de A a G, de acordo com a sua natureza antigénica. Os tipos A, B, E e F são causadores de botulismo no homem. Os tipos patogénicos para animais são predominantes C e D. O tipo G ainda é pouco conhecido, não tendo sido associado com doenças até ao momento.



Os alimentos mais sujeitos a serem contaminados pela produção destas toxinas são aqueles que sofrem alguns tratamentos térmicos com vista à sua conservação. Estão neste caso os alimentos enlatados, em conserva ou fumados, cujos tratamentos térmicos a que são sujeitos não permitem a destruição dos esporos do *Clostridium botulinum*. Assim, peixe, enlatados de vegetais e conservas de carnes elaborados em casa, frutos do mar e mel constituem os produtos alimentares de maior risco para a produção das toxinas botulínicas, principalmente se as matérias-primas estavam contaminadas e as condições de higiene não foram as adequadas.

A dose infetante é muito baixa podendo uma pequena quantidade de toxina (poucos nanogramas) causar a doença.

Caraterísticas da Doença

Os principais sintomas caracterizam-se pela perda de visão, dificuldades respiratórias e debilidade. Estes sintomas manifestam-se entre 12 a 36 horas após a ingestão dos alimentos contendo a toxina, mas pode ocorrer 2 horas depois ou mais tarde, como 8 dias. As náuseas e vômitos muitas vezes são os primeiros sintomas e a neurotoxina afeta primeiro as junções neuromusculares da cabeça e pescoço, impedindo a passagem de estímulos do nervo motor para o músculo, resultando dupla visão, incapacidade de focar, inclinação das pálpebras, alteração da fala e incapacidade de engolir ou falar claramente, fraqueza, vertigens. Na progressão da doença há falha muscular aumentada até os músculos necessários para a respiração ou músculos cardíacos falharem com consequente morte do paciente. Note-se que após o aparecimento dos primeiros sintomas poderá surgir a morte dentro de um dia.

O botulismo pode ser confundido com outras doenças incluindo síndrome de Guillan-Barré, miastenias graves e toxinfecções alimentares por outras bactérias. Os sinais do botulismo infantil consistem em obstipação, dificuldade em comer, letargia, fraqueza, secreções orais e gemidos ou choro alterados. A perda de controlo mental é notória.

Clostridium botulinum encontra-se amplamente distribuído na natureza, sendo o solo e o ambiente aquático seu habitat principal. Os sedimentos aquáticos também contêm número elevado de esporos de *Clostridium botulinum* e portanto os peixes apresentam um risco potencial.



Para que um alimento não seja causador de botulismo é necessário impedir que a neurotoxina botulínica venha a ser formada. Logo, é necessário impedir a germinação dos esporos e a proliferação de células de *Clostridium botulinum*, quando a toxina é formada. Um alimento não causará botulismo se todas as células vegetativas e esporos de *C. botulinum* forem destruídos. Esta destruição normalmente é obtida através de tratamento térmico elevado.

O congelamento, assim como a refrigeração, não tem qualquer efeito prático na destruição de células vegetativas, esporos ou neurotoxinas botulínicas.

Medidas de prevenção:

- Não adquirir nem ingerir alimentos cuja lata ou tampa se apresentem opada (inchada) ou enferrujadas;
- Não adquirir nem ingerir alimentos cujo conteúdo líquido se apresente turvo;
- Não adquirir nem ingerir alimentos cujo vidro se apresente turvo;
- Só consumir mel de procedência conhecida;
- Ferver alimentos enlatados antes do consumo, principalmente o palmito, já que este é um dos alimentos mais relacionados aos casos de botulismo (a toxina é destruída à temperatura de 65 a 80° C por 30 minutos; ou à 100 ° C por 5 minutos).

Clostridium perfringens

Este género inclui a espécie *C. perfringens* também conhecida por *C. welchii*, responsável pela produção de uma enterotoxina de natureza proteica, de elevado peso molecular e sensível ao calor. Esta espécie apresenta bastonetes móveis por flagelos peritríquios, esporulados, Gram positivos e apresenta cápsula. Uma das características mais importantes de *C. perfringens* é sua capacidade de multiplicação a temperatura alta. Embora não seja considerado um microrganismo anaeróbio estrito, o crescimento inicial é dependente do potencial de oxi-redução. Produz uma série de proteínas biologicamente ativas, algumas com atividade tóxica e outras com atividade enzimática. De acordo com a produção das quatro toxinas extracelulares mais importantes (toxinas alfa, beta, épsilon e iota), as estirpes de *C. perfringens* são classificadas em cinco tipos: A, B, C, D e E. Todos os cinco tipos produzem a toxina alfa,



que tem atividade fosfolipásica (lecitinase) e é hemolítica. A toxina beta é produzida por *C. perfringens* do tipo B e C, a toxina épsilon por *C. perfringens* tipos B e D e a toxina iota é produzida somente pelo tipo E.

As infecções por *Clostridium perfringens* estão normalmente associadas com a ingestão de pratos de carne ou frango pré-cozinhados, nos quais a cozedura não foi adequada e não foram rapidamente refrigerados, permitindo assim a germinação dos esporos que sobrevivam à pré-cozedura. Note-se que esta espécie, após a germinação dos esporos, tem capacidade de crescer a uma temperatura de 45°C e a pH 7, com um tempo de geração muitíssimo pequeno, da ordem dos 10 minutos. Isto significa que com esta capacidade de crescimento uma só célula pode originar uma população superior a 250.000 células em 3 horas!

A intoxicação alimentar é causada por uma enterotoxina que aparece quando se forma o esporo de *C. perfringens*. Seu papel no processo de esporulação não é conhecido. Mesmo as estirpes chamadas “não-enterotoxigênicas” produzem pequena quantidade de enterotoxina, mas essa quantidade é insuficiente para causar a doença. Acredita-se que este fenómeno ocorre porque o calor provoca, a nível genético, alterações no sistema regulador de produção da toxina.

A enterotoxina é formada durante o processo de esporulação. A esporulação de *C. perfringens* pode ocorrer excepcionalmente no alimento, mas este fenómeno ocorre principalmente no intestino. Entretanto, é pouco provável que a toxina pré-formada no alimento venha a causar intoxicação, uma vez que grandes quantidades de toxinas são necessárias para o desenvolvimento dos sintomas. Além disso, a enterotoxina não resiste ao pH ácido do trato digestivo, nem à ação das enzimas digestivas. Desta forma, a intoxicação alimentar ocorre pela ingestão de alimentos contendo números elevados de células viáveis de *C. perfringens*, que esporulam no intestino delgado, libertando a enterotoxina durante este processo.

A temperatura de 60°C as células vegetativas de *C. perfringens* são rapidamente inativas. A resistência térmica dos esporos pode variar de estirpe para estirpe.

Em geral, existem dois tipos de esporos: os termorresistentes e os termo-sensíveis. Os esporos da classe termorresistente requerem um choque térmico entre 75 a 100°C por 5 a 20 minutos para germinarem mais facilmente. As razões para esta diferença na resistência térmica ainda não estão suficientemente explicadas. Os esporos de ambas as



classes sobrevivem à cozedura dos alimentos e podem ter a sua germinação estimulada pelo aquecimento. Como se disse, é evidente que estirpes mais termorresistentes sobrevivem a períodos mais longos de aquecimento, e são, provavelmente, os principais responsáveis pelos casos de intoxicação alimentar.

Possui como habitats preferenciais o solo, sedimentos de águas marinhas ou doces e o intestino de animais e do Homem. A sua ampla distribuição na natureza é devida aos esporos que *C. perfringens* produz, altamente resistentes às condições ambientais (oxigénio, etc...).

Caraterísticas da Doença

A sintomatologia por infeções de *C. perfringens* é caracterizada pelo aparecimento de diarreias, dores abdominais e náuseas. Geralmente, não ocorrem vômitos nem febres. Usualmente, estes sintomas iniciam-se entre 8 a 20 horas após a ingestão dos alimentos contaminados.

Clostridium perfringens é o responsável por dois tipos diferentes de toxinfecção alimentar. Estirpes do tipo A causam a intoxicação alimentar na forma clássica e as do tipo C causam a enterite necrótica, bem mais grave.

Os sintomas da intoxicação alimentar por *C. perfringens* do tipo A são dores abdominais agudas, diarreia com náuseas e febre, sendo os vômitos raros. Os sintomas aparecem mais frequentemente entre 8 a 12 horas após a ingestão de alimentos contendo número elevado de células e a duração dos sintomas é frequentemente de 12 a 24 horas. Normalmente, esta intoxicação é muito comum, em todas as partes do mundo.

A enterite necrótica, causada por *C. perfringens* tipo C, é rara. Os sintomas são dores abdominais agudas muito intensas, diarreia ensanguentada, algumas vezes vômitos, e inflamação necrótica do intestino delgado, sendo frequentemente fatal. Os casos descritos na literatura têm sido associados ao consumo de carne de porco mal cozida.

Este microrganismo é facilmente isolado nos alimentos, tanto crus quanto processados, e seu envolvimento em casos de doenças de origem alimentar é bastante grande.

Alimentos à base de carne bovina e de carne de frango têm sido os principais causadores de intoxicação alimentar por *C. perfringens*. A maioria dos surtos relatados é associada à alimentação em estabelecimentos institucionais (restaurantes, hospitais, fábricas, escolas, etc.).



Cryptosporidium parvum - parasita

O *Cryptosporidium* é um pequeno parasita intracelular que ocorre no reino animal e tem sido encontrado em mamíferos, aves, répteis e peixe. O *Cryptosporidium parvum* tem uma distribuição por todo o mundo e tornou-se uma causa comum de infeções gastrointestinais em indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente com síndrome da imunodeficiência adquirida, como patogénico oportunista e de outro modo em pessoas saudáveis. A transmissão de um hospedeiro para outro é feita no estado de oocisto pela via fecal-oral, através da água ou alimentos contaminados, ou contacto de animais com o homem ou de pessoa a pessoa.

Caraterísticas da Doença

Os sintomas aparecem entre 1 a 6 semanas depois do contacto infetante e são diarreia grave, principalmente em pessoas imunocomprometidas, dores abdominais, distúrbios intestinais, náuseas, vómitos e febre, infeção pulmonar e traqueal associada a tosse e febre baixa. Os sintomas não específicos incluem perda de peso, dores, fraqueza e dores de cabeça. A doença dura entre 2 a 4 semanas, mas pode ir além das 4 semanas.

Os sintomas crónicos podem durar muito e são recorrentes. As populações com imunodeficiência podem ficar com a doença para sempre. A dose infetante é menor do que 30 cistos e as fontes de contaminação incluem água, solo, insetos, superfícies ambientais, contaminação fecal, animais crus e irrigação imprópria de frutos e vegetais.

O parasita é altamente infeccioso e parece ser uma das maiores causas de diarreia infecciosa em muitas partes do mundo, considerando-se que o maior risco provém da ingestão de alimentos frescos, crus ou mal cozinhados e de água contaminada.

Diphyllobothrium latum - parasita

É um parasita da classe *Cestoidea* que tem como hospedeiros definitivos os mamíferos que se alimentam de peixe. Existem muitos casos assintomáticos, outros com sintomatologia idêntica a uma gastroenterite e situações mais extremas, que podem levar a uma anemia macrocítica devido à deficiência em vitamina B₁₂. A eliminação de ovos nas fezes leva à contaminação de águas com desenvolvimento de formas intermédias em alguns peixes de que o salmão é um exemplo. A ingestão de peixes infetados pelos



hospedeiros definitivos fecha o ciclo do parasita. Peixe cru ou mal passado e sushi têm sido responsáveis pela sua transmissão. Nos povos com grande consumo de salmão e de outros peixes a incidência da parasitose é elevada.

Echinococcus - parasita

A equinococose (doença hidática) é uma parasitose causada pelo estado larvar do género *Echinococcus*. São conhecidas seis espécies que causam infeção. Na Europa *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis* que causam respetivamente a doença quisto hidático e doença alveolar hidática. O estado adulto *Echinococcus granulosus* vive no intestino delgado dos cães. O parasita adulto liberta ovos que são passados para as fezes. Carneiros, cabras, gatos e renas são os hospedeiros intermédios nos quais os ovos ingeridos eclodem e vão libertar as larvas do parasita. Esta larva pode entrar na circulação e migrar para vários órgãos, especialmente fígado e pulmões, onde desenvolvem o quisto hidático. O hospedeiro definitivo é infetado pela ingestão de órgãos do hospedeiro intermédio contendo quistos.

Os seres humanos são o hospedeiro final e podem ser infetados pela ingestão de ovos derramados nas fezes ou por cães infetados. Os ovos ingeridos eclodem no trato digestivo libertando o estado larvar que podem entrar na circulação e migrar para o fígado, pulmões e outros tecidos desenvolvendo quistos hidáticos. Estes podem manter-se intactos durante muitos anos e depois sofrerem rotura. Os sinais e sintomas clínicos da doença dependem da localização dos quistos e são muitas vezes similares aos induzidos pelo crescimento lento de tumores.

O *Echinococcus multilocularis* tem um ciclo similar ao anteriormente citado, provoca a equinococose alveolar que é altamente patogénica. É uma doença crónica “*cancer-like*” de considerável importância em saúde pública, dado que é fatal em pacientes não tratados.

Enterobacter sakazakii

Enterobacter sakazakii é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* e do género *Enterobacter*. A análise filogenética recente deste microrganismo levou a propostas de o recolocar num novo género, *Cronobacter*, e considerar uma nova espécie *Cronobacter sakazakii*. Esta espécie não faz parte da flora saprófita do trato gastrointestinal humano



ou animal mas existe no ambiente e nos alimentos *Enterobacter sakazakii* é uma das duas bactérias (sendo a outra *Salmonella* spp.) de grande preocupação nas fórmulas infantis em pó, dado que tem causado doença em todas as idades, sendo a maior parte dos casos em bebês com menos de 2 meses de idade.

Este microrganismo já foi associado a surtos de meningite em recém-nascidos, assim como a casos isolados e morte em todo o mundo.

Enterobacter sakazakii é reconhecida como sendo um agente patogênico oportunista, invasivo e emergente de origem alimentar, representando um risco para a saúde dos recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos. Com efeito, é o agente etiológico de casos graves mais raros de meningite, enterocolite necrosante, abscessos cerebrais e septicemia em crianças, sendo um risco maior para as crianças com menos de 28 dias, particularmente prematuras ou com baixo peso (menor que 2500 g). A contaminação de fórmulas infantis em pó pode ocorrer durante a produção ou durante a reconstituição.

As infecções por *Enterobacter sakazakii* em latentes, adultos e pacientes idosos podem apresentar uma multiplicidade de sintomas. Os sintomas na fase inicial são perda de apetite, irritabilidade, icterícia, dificuldade em respirar, dores, cianose, colapso, espasmos e variações térmicas.

No caso dos adultos, as manifestações clínicas associadas a infecções por *Enterobacter sakazakii* podem incluir septicemia, apendicite e por vezes este microrganismo atua como agente co-infetante. Nos idosos pode levar ao aparecimento de pneumonia.

Escherichia

Este género inclui uma única espécie bacteriana, a *E. coli*, porventura o ser vivo mais estudado e mais conhecido do Homem. Esta espécie é caracterizada por células em forma de bastonetes retos, de 1,1 a 1,5 por 2 a 6 micrómetros, móveis por flagelo peritríqueos ou imóveis, não esporulados, Gram negativos e anaeróbios facultativos. Constitui um habitante normal do intestino do Homem e dos outros animais e só em determinadas situações pode causar infeções. Conhecem-se, no entanto, três estirpes diferentes desta espécie, de acordo com a natureza da infeção que podem provocar:

- Estirpes oportunistas que são, em geral, inócuas no seu habitat natural, mas podendo causar problemas se alcançarem outros locais ou tecido do hospedeiro;



- Estirpes enteropatogénicas que provocam ações lesivas na mucosa do trato intestinal, causando gastroenterites agudas, principalmente em recém-nascidos e crianças até aos dois anos;
- Estirpes enteroxinogénicas, que, embora não tenham capacidade de invadir a mucosa intestinal, produzem enterotoxinas que atuam ao nível da membrana das células epiteliais.

Praticamente todos os alimentos, quer de origem vegetal, quer de origem animal que não tenham sido objetos de processamento, podem veicular a *E. coli*, desde que, em algum momento, tenham sido sujeitos a poluição fecal. Um dos casos mais alarmantes de infeção alimentar por *E. coli* ocorreu nos Estados Unidos, nos anos 80, por ingestão de queijo Camembert contaminado.

Sintomas

Os principais e mais frequentes sintomas caracterizam-se pelo aparecimento de diarreias, febre e náuseas que, normalmente, aparecem 6 a 36 horas após a ingestão do alimento contaminado.

Fasciola hepática - parasita

Os homens, os ovinos e os bovinos são os principais hospedeiros definitivos deste parasita hermafrodita que se instala no fígado e canais biliares, provocando lesões que podem levar à morte. A transmissão dá-se através das fezes dos animais parasitados que com determinadas condições ambientais dão origem a um miracídeo que pode permanecer dentro do ovo durante 9 meses, saindo dele quando estimulado pelo contacto com a água e com a luz solar. Esta forma intermediária quando sai do ovo nada até encontrar um hospedeiro intermediário, pequenos caracóis existentes nesses locais húmidos (género *Lymnea*).

Depois de um período mais ou menos prolongado no caracol são libertados cercarias que aderem aos vegetais aquáticos enquistando. É sobre essa forma que é ingerida pelos hospedeiros definitivos quando se alimentam de vegetais contaminados, migrando depois através da parede intestinal para a cavidade abdominal, através da cápsula de Glisson atravessam o parênquima hepático e canais biliares onde podem viver por



muitos anos. Os ovos são excretados 3 a 4 meses após a ingestão e o ciclo inteiro é completo em 4 a 6 meses.

A morbidade humana varia com o número de parasitas e o estadió da infeção. A fase aguda ocorre durante a migração do parasita para o fígado. A ingestão do parasita e a destruição do parênquima tecidular, hemorragia, morte parasitária e resposta inflamatória largamente mediada por eosinófilos resulta em patologia grave.

Os mecanismos de reparação podem levar a fibrose extensiva e ao aumento de pressão hepática e fibrose periportal. A fase crónica em que o parasita está presente nos canais biliares tende a ser menos severa.

O parasita pode formar lesões etópicas em muitos tecidos, sendo estes nódulos, granulomas ou tratos de migração muitas vezes mal diagnosticados como tumores malignos ou úlceras gástricas.

Quando os casos são sintomáticos podem surgir 2 meses depois da ingestão da metacercária diarreia, dores abdominais superiores, urticária, mal-estar, perda de peso, tosse, febre e suores noturnos. Os sinais da fase aguda são hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, fraqueza e eosinofilia periférica marcada até 80%.

O parasita adulto nos canais biliares pode estar associado a colangite, e colecistite com cálculos ou não.

A infeção pode levar a obstrução levando a iterícia colestática, náusea, prurido, dor abdominal e hepatomegalia e intolerância a gorduras.

Ficotoxinas - algas

As ficotoxinas são metabolitos secundários produzidos por algumas espécies fitoplantónicas marinhas e de água doce, tóxicos para muitos seres vivos, entre os quais o Homem. Para além de terem uma alta potencia para intoxicação humana (principalmente neurotóxica) e pouca capacidade imunogénica, são compostos estáveis e termorresistentes. Algumas espécies fitoplantónicas, em determinadas condições ambientais favoráveis (normalmente as condições de luz, temperatura e vento durante o período de primavera/verão e o estado eutrofizado dos recursos hídricos), desenvolvem-se a uma taxa de crescimento superior à normal, atingindo elevadas densidades celulares que se acumulam à superfície da água.



Como este tipo de algas microscópicas apresentam pigmentação forte (vermelha, verde, verde-azul), este fenómeno é conhecido por florescência ou Algal Bloom. Quando se trata de espécies tóxicas, designa-se por Harmful Algal Bloom (HAB).

A intoxicação humana por ficotoxinas é conhecida desde há séculos e tem sido maioritariamente atribuída à ingestão de bivalves contaminados. No ambiente marinho, as ficotoxinas são produzidas pelos dinoflagelados sendo organismos filtradores, concentram quantidades elevadas de toxinas, constituindo, assim, o principal vetor de intoxicação animal e humana, diretamente ou através da cadeia alimentar.

A ocorrência de inúmeros episódios de intoxicação humana grave, muitas vezes associada a casos de morte, levou as autoridades de muitos países, entre os quais Portugal, a implementar medidas de prevenção, tais como a monitorização de toxinas nos bivalves e a regulamentação dos respetivos níveis de tolerância.

Em reservatórios de água doce superficial (albufeiras, barragens, praias fluviais, etc.) os organismos fitoplantónicos associados à produção de ficotoxinas são as cianobactérias. Tal como os dinoflagelados, as cianobactérias constituem a base alimentar de alguns organismos que acumulam as suas toxinas ou são por elas afetadas. Porém, como o homem não consome moluscos bivalves de água doce, o veículo de intoxicação, neste caso, é a água contaminada. A presença de toxinas na água deve-se, essencialmente, à lise cianobacteriana decorrente do decaimento dos blooms e da aplicação de algicidas para a sua destruição.

Assim, a intoxicação humana com cianotoxinas pode ocorrer através da ingestão da água bruta durante atividades balneares em albufeiras contaminadas com cianobactérias tóxicas, da ingestão da água da rede e em unidades de hemodiálise, por insuficiência dos sistemas de tratamento normalmente usados nas estações de tratamento de águas para remoção das toxinas da água bruta. Contudo, em muitos países a contaminação dos reservatórios de água doce com cianobactérias tóxicas é frequente e tem sido responsável por episódios de intoxicação animal e humana. A crescente preocupação com este fenómeno levou à implementação de programas de monitorização com vista a alertar para possíveis situações de risco para a saúde pública.

De um modo geral, as ficotoxinas podem causar efeitos ao nível gastro-hepato-intestinal e/ou neurológico e a sua designação baseia-se quer no tipo de sintomas que provocam no Homem quer no organismo a partir do qual foram isoladas.



Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)- toxinas de *dinoflagelados*

DSP é a segunda intoxicação, por bivalves, mais registada em todo o mundo. A doença é causada pela ingestão de moluscos contaminados com toxinas de dinoflagelados *Dinophysis spp.* e *Prorocentrum lima*. A doença tem sido registada primariamente de mexilhões tóxicos, mas outros bivalves como ostras, lingueirão e vieiras estão também implicados. Os sintomas são similares aos das gastroenterites bacterianas. Os doentes queixam-se de diarreia, náuseas, vômitos, dores abdominais e calafrios. Os sintomas iniciam-se após cerca de 30 minutos a algumas horas após ingestão de bivalves contaminados, as vítimas recuperam em cerca de 3 dias. Não estão descritos casos letais associados à síndrome DSP.

Para além do efeito agudo as DSP são também promotores tumorais bastante potentes e, muito recentemente, considerados genotóxicos.

A síndrome DSP apresenta uma larga distribuição a nível mundial, em particular na Europa e no Japão cuja ocorrência é, aparentemente, sazonal.

Amnesic Shellfish Poisons (ASP) - diatomáceas

Origem: Espécies de diatomáceas do género *Pseudonitzschia*.

Foram reportados surtos na Costa do Pacífico dos Estados Unidos, na Nova Zelândia e na Europa.

Os sintomas incluem distúrbios gastrointestinais (diarreia, náuseas, vômitos e dor abdominal) e distúrbios neurológicos (tonturas, desorientação, letargia, perda permanente da memória recente), podendo levar à coma e morte.

Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) - dinoflagelados

NSP é causado por toxinas produzidas por dinoflagelados do género *Gymnodinium*.

A doença tem sido reportada por indivíduos que consumiram ostras, lingueirão e outros moluscos.

Os sintomas aparecem dentro de minutos depois do consumo dos bivalves tóxicos e geralmente diminuem dentro de horas ou poucos dias. Os sintomas incluem formigueiro e dormência dos lábios, língua, garganta e área perioral, dores e fraquezas musculares, desarranjo gastrointestinal e vertigens.



Alguns doentes queixam-se de sensação de calor e frio. Não foram reportadas sequelas ou casos de mortalidade. Os alimentos implicados têm sido bivalves como ostras, lingueirão e vieira.

Paralytic shellfish poisoning (PSP)

PSP é não só a intoxicação marinha com maior distribuição mundial, mas também a primeira a ser reconhecida e a ser estudada em todo o mundo. Casos devido a consumo de mexilhões foram reportados em França em 1689. A síndrome PSP é o envenenamento por bivalves contaminados com toxinas fitoplantónicas e foi considerado endémico na costa do Pacífico e do Canadá. É também abrangente a ocorrência de toxinas associadas a fitoplâncton de água doce (Austrália, Brasil, Dinamarca, Portugal, EUA).

Origem: Espécies de dinoflagelados marinhos dos géneros *Alexandrium sp.*, *Pyrodinium sp.* e *Gymnodinium sp.* e das cianobactérias de água doce dos géneros *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis*.

A doença ocorre geralmente em indivíduos que tenham comido mexilhões, lingueirão, ostras e vieira.

Dado que a PSP é termorresistente, tanto alimentos crus como cozinhados podem causar a doença.

Existe um bloqueio da propagação do impulso nervoso. Os sintomas aparecem entre 5 a 30 minutos depois da ingestão do molusco ou peixe tóxico e a gravidade e o prognóstico dependem da quantidade e tipo de toxina (s) consumida (s), se o doente está com o estômago vazio ou cheio e se consumiu álcool.

A saxitoxina é uma das mais potentes toxinas humanas estando descrito na literatura que 120 a 180ug desta toxina podem causar sintomas moderados e 0,5-2 mg podem causar a morte.

Em casos moderados de PSP, o doente sente uma sensação de formigueiro ou queimadura nos lábios, gengivas e língua que progride para o pescoço, braços, pontas dos dedos e muda mais tarde para dormência. Nos casos moderados a dormência estende-se para os braços e pernas tornando difíceis os movimentos voluntários. A ataxia é acompanhada pela sensação de escuridão (flutuar no ar). Pode ocorrer afasia, dores musculares, salivação, dor de cabeça, sede, náuseas e podem ocorrer vômitos. A intoxicação



aguda causa paralisia progressiva, levando a dificuldade respiratória. As vítimas estão conscientes durante a doença.

Nos casos não tratados a paralisia é progressivamente mais grave e a morte ocorre devido a paragem respiratória, geralmente dentro de 12 a 18 horas. Se o doente sobrevive até 12 horas, o prognóstico é bom e a recuperação não deixa sequelas.

Brevetoxinas - dinoflagelados

Origem: Dinoflagelado marinho da espécie *Gymnodinium breve*.

Distribuição: A ocorrência de episódios de intoxicação humana por brevetoxinas tem-se restringido, basicamente, à Carolina do Norte e Costa da Flórida. As toxinas têm também sido detetadas no Golfo do México, Nova Zelândia e Japão.

Os efeitos são similares aos de PSP, excluindo o efeito letal.

Ciguatoxinas - dinoflagelados

Origem: Dinoflagelado marinho da espécie *Gambierdiscus toxicus*.

Contrariamente às outras espécies produtoras de ficotoxinas, este dinoflagelado é epifítico e cresce associado a corais. Constitui a base alimentar de peixes herbívoros que, por sua vez, são o veículo de intoxicação para o Homem.

Distribuição: Regiões tropicais de recifes de coral.

Provoca distúrbios gastrointestinais (diarreia, náuseas, vômitos e dor abdominal intensa) e distúrbios neurológicos (dormência das extremidades e lábios, sensação de alternância da temperatura, dores musculares e das articulações, dores de cabeça, comichão, taquicardia, hipertensão, visão turva e paralisia).

Ocasionalmente, é fatal. A sintomatologia varia geograficamente: os efeitos gastrointestinais predominam na região das Caraíbas, enquanto no Pacífico predominam os efeitos neurológicos.

Este facto poderá dever-se á variação qualitativa das toxinas envolvidas.

Microcistinas - cianobactérias

Origens: Espécies pertencentes aos géneros *Microcystis*, *Oscillatoria* e *Anabaena*, que são cianobactérias predominantes nas florescências de águas doces.



Distribuição: As microcistinas são consideradas as cianotoxinas com uma maior distribuição mundial.

A ocorrência de blooms tóxicos tem sido descrita na Europa (Dinamarca, Reino Unido, Finlândia, França, Alemanha, Irlanda, Holanda, Noruega, Portugal, Rússia, Eslovénia), América (Brasil, Canadá, USA), Ásia (China, Japão), na África do Sul e Austrália.

A hepatotoxicidade resulta da capacidade das microcistinas entrarem em poucos minutos no sistema de transporte dos ácidos biliares nos hepatócitos, causando a hiperfosforilação de proteínas e a reorganização irreversível dos microfilamentos celulares. Desenvolvem-se sintomas de gastro-hepato-enterite e em poucas horas a intoxicação poderá culminar numa hemorragia intrahepática letal.

Para além do efeito agudo, as microcistinas são também consideradas promotores tumorais.

A hiperfosforilação proteica, induzida pelas microcistinas, produz um estado similar à mitose, causando um crescimento tecidual que associa o efeito inibitório das fosfatases pelas microcistinas à sua actividade de promoção tumoral. Estudos muito recentes indiciam, também, uma possível acção genotóxica.

Noutros países como Austrália e China estudos epidemiológicos apontam para o aumento da incidência de efeitos agudos adversos decorrentes do contacto com a água contaminada com cianobactérias.

Adicionalmente, na China verificou-se a correlação entre a frequência da ocorrência de cianobactérias produtoras de microcistinas e o aumento da incidência de cancro hepático.

Nodularinas

Origem: *Nodularia spumigena*.

Distribuição: Austrália, Nova Zelândia e Mar Báltico.

Efeitos e Sintomatologia: Similares aos das microcistinas.

Anatoxinas

Origem: Espécies pertencentes aos géneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* e *Aphanizomenon*.



Distribuição: A ocorrência de blooms tóxicos tem sido descrita na Europa (Dinamarca, Reino Unido, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Itália, Noruega), América (Canadá, USA), Ásia (Japão, Coreia do Norte).

Efeito Agudo: Anatoxina-a: Paralisia, asfixia e morte. Anatoxina-a(S): Hipersalivação, lacrimagem, cianose da mucosa oral, dispneia, incontinência e morte.

Têm sido registados casos de envenenamento animal por ingestão de água contaminada por cianobactérias produtoras de anatoxinas.

***Giardia* - protozoário**

Giardia spp. é um protozoário flagelado normalmente encontrado aderente ao epitélio superficial do intestino delgado. O ciclo de vida e a forma móvel divide-se por fissão binária para produzir mais trofozoitos.

Intermitentemente os trofozoitos formam cistos resistentes que são eliminados pelas fezes do hospedeiro.

A infeção por *G. intestinalis* é o mais comum parasita protozoário intestinal no mundo que infeta o homem. *Giardia* tem sido encontrada nos bovinos, carneiros, cabras, cavalos, gatos e roedores.

A transmissão dos cistos é feita via fecal-oral através da água ou alimentos contaminados e contacto entre animais e entre pessoas. Os cistos podem manter-se infecciosos durante meses em condições apropriadas ao parasita. A infeção por *Giardia* está relacionada com más condições sanitárias e de higiene, podendo estar associadas a viagens.

Os sinais mais proeminentes da giardiose no homem são náuseas, desconforto intestinal, fadiga, diarreia aquosa, flatulência, distensão abdominal, geralmente durando poucos dias. Ocasionalmente, esta fase aguda pode durar meses, causando má absorção, perda de peso e debilidade.

Listeria

O género *Listeria* é uma bactéria que compreende 6 espécies, mas os casos humanos são quase exclusivamente causados pela espécie *Listeria monocytogenes*.

L. monocytogenes é uma bactéria ubiquitária, ocorrendo tanto em ambientes agrícolas (solo, plantas e água) como em ambientes de processamento de alimentos. A bactéria é resistente a várias condições adversas como elevada acidez e concentração de sal;



crece em baixas concentrações de oxigénio e temperaturas de refrigeração, sobrevive por longos períodos no ambiente, nos alimentos, nas fábricas de produtos alimentares e nos frigoríficos domésticos.

A *L. monocytogenes* encontra-se frequentemente presente em alimentos crus (tanto de origem animal como vegetal), podendo também estar presente em alimentos cozinhados que sofreram contaminação após processamento. Tem sido isolada de alimentos como carnes cruas e prontas a comer, aves, leite cru, queijo (principalmente as variedades de pasta mole), gelados de natas, peixe cru, peixe fumado, vegetais crus. Mesmo quando o número inicial de células de *L. monocytogenes* é baixo no alimento contaminado, o microrganismo pode multiplicar-se durante o armazenamento, inclusivé a temperaturas de refrigeração.

Cozinhar mata a *Listeria*, mas a bactéria multiplica-se a temperaturas baixas 2 a 4°C, o que torna a ocorrência em alimentos prontos a consumir com relativamente longo tempo de prateleira um problema particular.

A dose infetante da *Listeria* é desconhecida, variando com a estirpe e com a suscetibilidade da vítima.

Caraterísticas da Doença

A listeriose é transmitida essencialmente através do consumo de alimentos contaminados com a bactéria *Listeria monocytogenes*. A maioria das listerioses adquiridas por contacto com animais infetados manifesta-se sob a forma de infeções de pele e atinge principalmente veterinários e criadores de animais.

Tal como outras tox infeções alimentares, a listeriose pode ser prevenida cumprindo rigorosamente as 4 regras “universais” de higiene e de segurança alimentar. Adicionalmente, e porque garantir a ausência de *L. monocytogenes* em todos os produtos é uma tarefa impossível, os indivíduos mais suscetíveis a contrair a infeção devem evitar o consumo dos alimentos que apresentam maior probabilidade de estarem contaminados. A sintomatologia é muito parecida com o quadro patológico da meningite, podendo provocar abortos em grávidas infetadas por esta espécie bacteriana. O aparecimento dos sintomas após a ingestão do alimento contaminado é muito variável e ocorre com particular incidência nos recém-nascidos e nos idosos.



Os sintomas aparecem entre 4 dias a algumas semanas e podem variar de sintomas moderados tipo gripe e diarreia a graves, como septicemia e meningoencefalites e abscessos, podendo a infeção durar dias a semanas. As infeções humanas são raras mas a doença é muitas vezes severa e a mortalidade alta, principalmente em populações de risco.

Micotoxinas - fungos

Micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos, capazes de produzir efeitos tóxicos agudos e crónicos (carcinogénios, mutagénicos, teratogénicos, imunotóxicos e estrogénicos) em animais e humanos, podendo estar presentes uma variedade de sinais clínicos não específicos e sintomas como rash (comichão e vermelhidão), conjuntivite, hemorragia nasal, apneia, tosse, náusea e vómitos.

Os pediatras devem ser capazes de reconhecer que vómitos, problema na medula óssea, hemorragia pulmonar aguda, apneia recorrente e/ou pneumonia podem ser causados por micotoxinas.

Devido à variedade de maneiras em que a doença relacionada com micotoxinas se manifesta clinicamente, a hipótese de ser confundida com outras doenças é grande, sendo por isso considerada a doença “Great Masquerader” do século XXI. (Etzel, 2006) Estas toxinas ocorrem naturalmente e são produzidas por certos fungos que podem crescer em vários alimentos como cereais, nozes, frutos secos, maçãs e legumes, sob certas condições ambientais.

A maior parte das micotoxinas são estáveis e sobrevivem ao processamento alimentar, sendo as mais importantes as aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas (toxinas produzidas pelo *Fusarium spp.*) e patulina.

Os fungos mais toxinogénicos na Europa são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium spp.*.

As questões a considerar quando a ingestão de micotoxinas é suspeita são:

- As pessoas que comeram o mesmo alimento estão doentes?
- Os sintomas começaram entre alguns minutos a 3 horas depois do consumo?
- Algumas aves de estimação ou animais comeram o mesmo alimento e ficaram doentes?
- A diarreia está ausente ou é uma parte não significativa da doença?



Aflatoxinas (AFTs)

As AFTs consistem num grupo de aproximadamente 20 metabolitos de fungos relacionados, embora só as AFTs B1, B2, G1 e G2 estão normalmente presentes em alimentos com exceção da AFT M1 qm que o leite é o alimento veículo mais frequente.

A Aflatoxina B1 é a mais importante desta família de compostos e é produzida por 3 espécies relacionadas: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*.

Os bolores aflatoxigénicos ocorrem em partes quentes do mundo e as AFTs podem ser produzidas numa grande variedade de produtos como figos, nozes e cereais, temperos e frutos secos, milho, amendoim e outras sementes.

As AFTs são altamente hepatotóxicas sendo a sua toxicidade influenciada pelo seu metabolismo depois de entrar no corpo e pode ser encontrada assim como os seus derivados no sangue, urina e leite humanos.

Aflatoxina B1 é responsável por necrose hepática após exposição crónica e pode ser envolvida na epidemiologia do cancro hepático em algumas partes do mundo. A ingestão massiva de aflatoxina pode resultar em aflatoxicose com vómitos, dor abdominal, hepatite e às vezes morte.

O risco associado com exposição a AFTs é potenciado pela exposição simultânea à hepatite B e eventualmente C.

Ocratoxinas

A ocratoxina A é produzida por *Penicillium verrucosum* em climas temperados e por algumas espécies de *Aspergillus* nos sítios quentes e tropicais do mundo. A mais importante espécie de *Aspergillus* produtores de ocratoxinas A é *A. ochraceus*. *P. verrucosum* está especialmente associado a cereais armazenados, embora também tenha sido isolado a partir de carne e peixe.

A ocratoxina A também foi encontrada no leite, café (grão e bebida), vinho, cerveja e sumo de uvas, temperos, soja, cacau, nozes, arroz e milho, frutos secos, cereais e leguminosas.

A ocratoxina está muito espalhada nos alimentos e a sua presença nos fluídos humanos confirma que há uma exposição significativa dos seres humanos.

A ocratoxina é considerada carcinogénica e nefrotóxicas com propriedades genotóxica, imunossupressora e inibidora da síntese proteica.



Fumonisin

A ação tóxica das fumonisin parece resultar da competição com a esfingosina no metabolismo esfingolipídico. O efeito em humanos ainda não está completamente estabelecido, mas a evidência sugere efeito carcinogénio no esófago.

O maior produtor de fumonisin é *Fusarium moniliforme* e espécies relacionadas que são endémicas no milho e produtos à base de milho em todo o mundo.

Desoxinivalenol e nivalenol

São produzidas por espécies de *Fusarium*. Os sintomas nos humanos incluem anorexia, náuseas, vômitos, dores de cabeça e abdominais, diarreia, calafrios, vertigens e convulsões.

A maior fonte desta toxina é *F. graminearum* que é endémica no trigo e outros cereais em todo o mundo (milho, cevada, aveia, centeio, malte, cerveja e pão).

Zealarone

Zealarone é uma toxina estrogénica, com atividade anabólica e promotora do crescimento produzida pelo *Fusarium graminearum* e espécies relacionadas, que se encontra nas espigas de milho e grãos de cereais (cevada, milho, trigo, arroz, aveia, sorgo, gergelim e pão).

Os agentes estrogénicos podem aumentar os níveis plasmáticos de colesterol e triglicéridos em mulheres.

Esta toxina tem sido implicada em alguns incidentes de mudanças da puberdade precoce em crianças.

Patulina

A patulina é um metabolito tóxico produzido por algumas espécies de bolores do género *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*, que crescem em frutos, incluindo maçãs, peras, uvas e outras frutas, cereais especialmente maltados e cevada, mas o mais importante no contexto da produção alimentar humana é o *Penicillium expansum*, um patogénio que apodrece as maçãs e peras.

O UK Committee on Mutagenicity classificou a patulina como mutagénico. Os sintomas em humanos reportados devido a toxicose por patulina são náuseas, vômitos e distúrbios gastrointestinais, embora não tenha sido descrito até agora nenhum surto.



Algumas análises feitas em Portugal mostram valores altos de aflatoxinas em frutos secos e nozes nos pontos de controlo de importação, embora nas lojas de retalho os valores sejam mais baixos.

Quanto à ocratoxina, a incidência em artigos alimentares é alta, mas com níveis baixos, embora em certos alimentos como café torrado, uvas e mistura para barbecue os níveis sejam um pouco preocupantes.

Mycobacterium bovis Tuberculose

A tuberculose é uma doença grave em humanos e animais, causada por espécies da família das *Mycobacteriaceae*, mais especificamente por espécies do *Mycobacterium tuberculosis complex*.

Este grupo inclui *Mycobacterium bovis* responsável pela tuberculose bovina que afeta uma grande variedade de animais de sangue quente incluindo o homem. A maior via de transmissão de *M. bovis* a humanos é através dos alimentos contaminados (principalmente leite e produtos láteos) ou contacto direto com animais infetados.

Salmonella

O género *Salmonella* inclui várias espécies patogénicas para o homem e outros animais. Tal como a *E. coli*, este género pertence à família das *Enterobacteriaceae* e os principais focos de infeção são as fezes humanas e de animais. Este género é constituído por bastonetes de 0,5 a 0,7 por 1 a 3 micrómetros, móveis por flagelos peritríquios, não esporulados, Gram negativos e anaeróbios facultativos. Nas espécies mais importantes incluem-se o agente da febre tifoide, *S. typhi*, e as espécies mais associadas às infeções alimentares têm sido identificadas como *S. typhimurium*, *S. enteritidis* e *S. newport*, correspondendo à *S. typhimurium* a responsabilidade pelos maiores incidentes. Esta última espécie produz uma enterotoxina de natureza lipopolissacarídica com elevado peso molecular. Os alimentos mais suscetíveis à contaminação por *Salmonella* são o leite, queijos, chocolates, carnes frescas, nomeadamente, carcaças de aves e ovos.

Caraterísticas da Doença

Os sintomas mais frequentes caracterizam-se pelo aparecimento de diarreia aquosa, dores abdominais, febre e vómitos. Pode surgir o aparecimento de pontos vermelhos nos



ombros, tórax ou abdómen. As complicações podem levar a hemorragia intestinal, desde úlceras no íleon ou perfuração intestinal. Estes sintomas aparecem, normalmente, entre 12 a 36 horas após ingestão dos alimentos contaminados. No entanto, e dependendo da estirpe pode levar de 7 a 28 dias até ao aparecimento dos sintomas.

Shigella

O género *Shigella*, tal como os géneros anteriores, pertence à família das enterobactérias, é constituído por bastonetes de 0,4 a 0,6 por 1 a 3 micrómetros, imóveis, não esporulados, Gram negativos e anaeróbios facultativos. As espécies deste género são os agentes causais da disenteria bacilar no Homem, tendo-se isolado quatro espécies associadas a esta doença no Homem: *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. flexneri* e a *S. sonnei*. Estas espécies são restritas aos humanos, sendo a poluição fecal a sua principal via de contaminação e dispersão.

Caraterísticas da Doença

A desinteria bacilar tem um período de incubação de 15 - 20 horas seguintes à ingestão do alimento contaminado e é uma doença caracterizada por diarreia aquosa, que é seguida em poucos dias pelo aparecimento de muco nas fezes, com ou sem sangue. Em geral é uma doença autolimitada, durando 5 a 6 dias. Em crianças, idosos e doentes imunocomprometidos a doença pode ser fatal.

Os surtos de shigeloses são sazonais com maior incidência durante os meses mais quentes do ano. Dado a dose infetante ser muito baixa, a possibilidade de disseminação é muito alta tornando as condições sanitárias e a educação de boas práticas de higiene pessoais um fator muito importante para reduzir o número de incidentes de disenteria bacilar.

A shigelose é endémica em muitos países em desenvolvimento e é a mais importante causa de diarreia com sangue em todo o mundo.

Staphylococcus aureus

Esta espécie apresenta células de forma esférica, de 0,5 a 1,5 micrómetros de diâmetro, formando arranjos irregulares, imóveis, não esporulados, Gram positivos e anaeróbios facultativos. A sua presença nos alimentos pode provir dos próprios



manipuladores de alimentos portadores de infecções piogénicas ou de portadores são que alojam estas bactérias no nariz, na garganta ou à superfície das mãos. Produz uma exotoxina termorresistente, não afetada pela exposição a uma temperatura de 100° C, durante 30 minutos. Os alimentos mais suscetíveis à produção da toxina estafilocócica são os cremes deficientemente armazenados e refrigerados, carnes preparadas, sanduíches e mesmo leite, se incorretamente refrigerados. Esta bactéria existe no ar, pó, esgotos, águas, alimentos e equipamentos alimentares, superfícies ambientais, humanas e animais.

A dose infetante é baixa dado que uma dose de toxina inferior a 1,0 micrograma em alimentos contaminados produzirá doença.

Caraterísticas da Doença

Os principais sintomas caracterizam-se pelo aparecimento de náuseas, vómitos, dores abdominais, diarreia, suores, dor de cabeça e por vezes diminuição da temperatura corporal. Aparecem entre 1 a 8 horas após a ingestão do alimento contaminado. Em casos graves pode ocorrer colapso mas a recuperação é rápida (dentro de 2 dias) e discreta.

S.aureus causa intoxicação provocada pela ingestão do alimento que apresenta a toxina pré-formada, sendo que o agente causal não é a bactéria, mas várias toxinas (A,B,C1,C2,C3,D,E) produzidas por ela que são as enterotoxinas. Atualmente sabe-se que a *S.intermedius* e *S.hyicus* também produzem tais toxinas.

Taenia solium / saginata

O homem é o único hospedeiro definitivo podendo ser também intermediário da *Taenia solium*.

Nos animais, os hospedeiros intermediários são os bovinos para a *T. saginata* e os suínos para a *T. solium*.

As teniases são na maior parte dos casos assintomáticos, vivendo os parasitas no intestino delgado, sendo a sua ação meramente espoliativa dos nutrientes do hospedeiro.

As proglótis eliminadas pelas fezes do homem parasitado libertam no exterior os ovos que contêm, podendo estes ser ingeridos pelo porco ou bovinos. Nestes, após migração interna e transformação, vão alojar-se nos músculos. A ingestão, pelo homem, de carne



infetada com a forma intermédia (cisticerco), fecha o ciclo permitindo que o verme atinja a forma adulta no intestino delgado.

Pode acontecer autoinfecção do homem quando ingere os ovos de *T. solium* através dos alimentos ou devido a deficiência de higiene pessoal. Quando o homem é hospedeiro intermediário deste parasita, o cestodo pode desenvolver-se até à forma de cisticerco.

Sob esta forma pode alojar-se nos músculos estriados, coração, olhos e cérebro provocando, por vezes, lesões irreversíveis.

A neurocisticercose é um dos grandes problemas da saúde pública sendo também um problema em vários países, sobretudo em algumas populações rurais.

Toxoplasma

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório existente em todo o mundo, cujo ciclo de vida implica o gato como hospedeiro definitivo, embora na sua fase assexual possa infetar uma grande variedade de animais incluindo o homem. O homem pode adquirir toxoplasmose pela ingestão de cistos esporulados ou viáveis na carne de animais infetados. Pensa-se que a maior fonte de infeção dos animais resulte da contaminação do ambiente com cistos das fezes de gato, que podem permanecer infecciosos por um ano ou mais se tiverem condições favoráveis. A transmissão pela via alimentar dos cistos em carne crua ou mal cozinhada é a mais usual no homem.

Os sinais clínicos podem ser variáveis porque o parasita pode infetar todos os órgãos do corpo.

No homem a toxoplasmose é normalmente assintomática ou associada a sintomas ligeiros, muitas vezes só caracterizados por linfadenopatia envolvendo os nódulos linfáticos cervicais posteriores. A infeção aguda pode causar anemia, dermomiosite, encefalite, enterite, febre, hepatite, linfadenite, miocardite, infeção placentária, pneumonia, retinocoroidite, miosite esquelética, amigdalite e vasculite.

Geralmente os sinais manifestam-se de uma semana a um mês depois da exposição.

A duração, gravidade e desenvolvimento da doença variam com o estado imunitário do hospedeiro.

Embora em doentes imunocomprometidos possa ser grave com envolvimento cerebral, o mais grave é a infeção congénita e o aborto na mulher grávida, sendo as lesões no feto maiores quanto mais cedo a grávida infetar.



***Trichinella* - parasita**

Triquinelose é uma doença zoonótica causada por parasitas nemátodos do género *trichinella*.

O parasita tem uma grande variedade de espécies hospedeiras, nomeadamente mamíferos.

As espécies de *Trichinella* ultrapassam todas as fases do ciclo de vida no corpo de um único hospedeiro.

Na Europa, a triquinelose tem sido descrito como emergente e/ou reemergente durante as últimas décadas.

Os seres humanos adquirem a infeção comendo carne de porco, de javali e outras carnes de caça. O cavalo, cão e carne de outros animais têm também transmitido a infeção. A carne de cavalo foi identificada como fonte de infeção em casos de surtos na UE entre meados dos anos 70 até 2005.

A prevenção da doença pode ser conseguida com a cozedura completa da carne e a congelação minimiza a infeciosidade do parasita, podendo mesmo destruí-lo caso a espessura das peças de carne e o tempo de congelação sejam adequados.

Os sinais clínicos da triquinelose aguda em humanos são caracterizados por 2 fases: a primeira pode incluir náuseas, diarreia, vómitos, fadiga, febre e desconforto abdominal. Porém esta fase de sintomas inclui dores musculares e de cabeça, febre, olhos inchados, dores nas articulações, calafrios, tosse, prurido cutâneo, diarreia ou obstipação. Nos casos mais graves pode haver dificuldade de coordenação de movimentos assim como problemas respiratórios e cardíacos. Podendo uma pequena percentagem de casos levar à morte.

Yersinia

Este género possui as características gerais dos anteriores, pois inclui-se também na Família das *Enterobacteriaceae*. Apresenta bastonetes, Gram negativos e não esporulados, destacando-se a espécie *Y. enterocolitica*, como causadora de infeções alimentares por ingestão de alimentos constituídos à base de leite e de carnes brancas (perú).

Caraterísticas da Doença

Os principais sintomas manifestam-se pelo aparecimento de dores abdominais, náuseas, diarreia e vómitos, aparecendo de 16 a 48 horas após a ingestão dos alimentos. Mas os



sintomas podem desenvolver-se ao fim de 7 dias depois da exposição e podem durar 1 a 3 semanas, ou mais tempo.

A infeção é muitas vezes adquirida ingerindo comida contaminada, como carne de porco mal cozinhada ou crua, em leite ou água contaminada.

A capacidade da bactéria desenvolver-se a 4°C faz da comida refrigerada, com tempo de prateleira relativamente longo, uma provável fonte de infeção. Para além disso a bactéria pode sobreviver durante um longo período em alimentos congelados, embora seja destruída por pasteurização, cozinhada normalmente.

Vibrio

O género *Vibrio*, da Família das *Vibrionaceae*, inclui duas espécies patogéneas para o Homem, nomeadamente, o *V. cholerae*, responsável pela cólera, e uma outra espécie halofílica, bem adaptada aos ambientes marinhos, designada por *V. parahaemoliticus* e associada às infeções alimentares por ingestão de peixe, moluscos e crustáceos contaminados. A espécie *Vibrio parahaemoliticus* é constituída por bastonetes encurvados, móveis por um único flagelo polar, não esporulados, Gram negativos e anaeróbios facultativos.

Caraterísticas da Doença

Os principais sintomas de infeções provocadas por *V. parahaemoliticus* são: desidratação provocada por diarreias excessivas, dores abdominais, vómitos e febre. Estes sintomas aparecem normalmente entre 12 a 18 horas após a ingestão dos alimentos contaminados.

Vírus

A contaminação de alimentos e água representa uma ameaça à saúde humana.

Os casos de surtos alimentares de origem viral estão a aumentar por causa do aumento da população, escassez de água limpa, mudança de hábitos alimentares e devido ao comércio internacional onde os produtos são consumidos longe da sua origem.

A contaminação dos alimentos ocorre durante a preparação por manipuladores infetados ou pelo contacto com águas de esgoto ou água poluída.



Como estes surtos são maioritariamente de origem entérica a prevenção da contaminação fecal é a primeira linha de atuação preventiva quer seja pela cozedura dos alimentos ou pelas boas práticas de higiene na sua manipulação.

Os vírus entéricos podem sobreviver durante longos períodos nos alimentos e no ambiente de manipulação e são altamente resistentes à refrigeração, à congelação, à ação de preservativos e ionização por radiação, embora sejam destruídos pelo calor.

Como os vírus não crescem nos alimentos, porque precisam de células vivas para se replicar e quase todas as viroses humanas de origem alimentar são devido a vírus estritamente patogénicos para o homem, a transmissão via alimentar reflete contaminação fecal, com persistência do vírus no alimento mas não com a sua replicação. Para além disso as viroses de origem animal são altamente infecciosas, onde a dose infetante é muito baixa (10-100) e altas doses de vírus são eliminados pelos vómitos ou pelas fezes dos indivíduos infetados. Este facto faz com que, se a transmissão alimentar da doença não for detetada inicialmente, o surto pode ser atribuído a contágio pessoa a pessoa e não ao alimento que deu origem à infeção.

Os bivalves, produtos frescos e prontos a comer são especialmente vulneráveis a contaminação viral porque são ingeridos crus ou estão em contacto com água ou gelo contaminados ou submetidos a más práticas de higiene na manipulação. Embora surtos virais associados a bivalves tenham ocorrido durante décadas, outros tipos de alimentos têm sido recentemente implicados em grandes surtos virais, devido ao aumento do seu consumo por razões de saúde e por serem importados de áreas com poucas restrições sanitárias.

Embora as doenças de origem animal viral sejam um problema significativo, os alimentos são raramente testados para pesquisa de contaminação viral, sendo este teste feito unicamente a bivalves.

Recentes estudos epidemiológicos evidenciam que vírus entéricos, em particular Norovirus, que causam gastroenterites agudas, mas também Vírus da hepatite A são as maiores causas de doenças de origem alimentar em países desenvolvidos.

SRSV (Norovírus)

Small round structured viruses (SRSVs) ou Norwalk/Norwalk-like viruses (antigamente denominados Norovírus) estão normalmente implicados em gastroenterites de origem



alimentar particularmente devido à ingestão de moluscos bivalves ou à existência de manipuladores infetados.

O período de incubação é de cerca de 24 horas, com uma variação de 15 a 50 horas dependente da dose, podendo provocar náuseas e vômitos, febre baixa e diarreia suave e moderada.

As fezes não têm sangue, muco ou glóbulos brancos. Pode provocar dores abdominais ou cólicas e dor de cabeça.

Geralmente a doença é moderada e autolimitada e os doentes raramente necessitam de hospitalização, mas são altamente infecciosos.

Os alimentos que têm sido implicados em gastroenterites por SRSV incluem saladas, produtos de pastelaria, sandes, hamburgers, fruta seca, carnes frias e outros alimentos frios.

Estes vírus são primariamente transmitidos pela via fecal-oral, pelo consumo de alimentos ou água contaminados fecalmente, ou por disseminação pessoa a pessoa. A segunda disseminação pode ocorrer por via aérea.

Os surtos ocorrem geralmente em estabelecimentos coletivos onde é partilhada a comida e a água.

Confirmação laboratorial: deteção viral nas fezes ou vômito do doente ou seroconversão entre a fase aguda e convalescente ou visualização de vírus que reagem com o soro do doente convalescente e não na fase aguda por microscopia imunoeletrónica.

Rotavírus

O rotavirus do grupo A é a mais importante causa de diarreia em crianças em todo o mundo mas raramente implicado em surtos de gastroenterites virais de origem alimentar.

O rotavirus é transmitido via fecal-oral e causa doença no homem e em animais com as subsequentes perdas económicas.

O rotavirus do grupo B tem causado gastroenterites graves no adulto na China através do consumo de água contaminada.

O rotavirus do grupo A causa um terço de hospitalizações por diarreia em crianças com idade inferior a 5 anos e o pico da infeção ocorre nos meses de inverno. As crianças com idade de 6 meses a 2 anos são as mais suscetíveis. Embora muitas crianças fiquem imunes pelos 4 anos, um alto inoculo ou estados imunitários deprimidos podem levar a doença moderada entre crianças mais velhas e adultos.



O período de incubação de gastroenterites por rotavirus é de 1 a 2 dias. Os vômitos ocorrem por 3 dias acompanhados de diarreia aquosa por 3 a 8 dias e muitas vezes dores abdominais e febre.

O vírus é eliminado pelas fezes durante 5 a 7 dias. Embora a infecção induza uma certa imunidade, esta não confere proteção completa a futuras infecções. Também é conhecida a sua associação a diarreias do viajante.

Conformação laboratorial: detecção do antígeno viral nas fezes do doente.

Vírus Hepatite A

O vírus da hepatite A pode causar surtos de origem alimentar em que os manipuladores infetados têm um papel predominante. A dose infetante é desconhecida mas presume-se que será entre 10-100 partículas virais.

A transmissão é via fecal-oral, sendo em primeiro lugar transmitido pelo contacto de pessoa com pessoa, embora a fonte epidérmica sejam alimentos e água contaminados, principalmente em más condições sanitárias.

O primeiro sítio da replicação viral é o fígado e a infecção tem um período de incubação de 10 a 50 dias, dependendo da dose infetante, podendo ser assintomática, subclínica e hepatite icterícia ou não icterícia.

Os sintomas podem ser ligeiros a graves e prolongados. O paciente antes do início da hepatite desenvolve anorexia, febre, dores, fadiga, mialgia, urina escura, náuseas, vômitos e ocasionalmente diarreia.

Uma ou duas semanas depois aparecem os sintomas característicos da hepatite como virémias e icterícia.

Os doentes infetados são infeciosos antes do início da hepatite e alguns dias depois do desenvolvimento da icterícia. A excreção de vírus em indivíduos infetados antes do aparecimento dos sintomas clínicos é um importante fator para a transmissão via alimentar, sendo o modo de transmissão a via fecal-oral e o veículo mais comum os bivalves de águas poluídas ingeridos crus ou mal cozinhados.

Entre outros alimentos encontramos alimentos sortidos frios, sanduíches, frutos, sumos de fruta, leite e derivados, vegetais, saladas e bebidas geladas tendo os manipuladores de alimentos um importante papel na transmissão da infecção. Os surtos são comuns em instituições coletivas.



Vírus Hepatite E

O vírus da hepatite E é considerado a maior agente etiológico de hepatites não A e não B transmitido por via entérica em todo o mundo. O vírus é transmitido por via fecal-oral e ocorre na Ásia, norte de África, América latina incluindo México, onde os surtos com origem no consumo de água são comuns.

Nos anos recentes tem sido identificado na Europa, Austrália e EUA.

O vírus da hepatite E provoca uma doença aguda com sintomas moderados.

É geralmente autolimitada e não progride para o estado crónico ou portador. O vírus infeta o fígado e provoca sintomas de hepatite depois de um período de incubação de 22-60 dias.

Os sintomas podem incluir virémia, náuseas, urina escura e dores em geral.

O vírus é excretado na bÍlis e fezes 2 semanas antes da elevação de enzimas hepáticos até à sua normalização.

A análise de infeções virais de origem alimentar revela que os vírus SRSV são a maior causa de gastroenterite epidérmica e a sua importância relaciona a diversidade de estirpes circulantes e a perda de imunidade a longo prazo, que permite a reinfeção ocorrer em intervalos regulares.

Outros vírus entéricos como astrovirus e calcivirus são infeções predominantemente pediátricas, aumentando a imunidade a longo prazo, que persiste no adulto.

Este facto explica a raridade de infeções de origem alimentar por estes vírus assim como por rotavirus.



BIBLIOGRAFIA

- FERREIRA, W.; SOUSA, J. C., *Microbiologia*. Vol. I, II e III. Lisboa: Lidel, 1998-2002.
- FORSYTHE, S. J., *Higiene de los alimentos: Microbiologia y HACCP*. Zaragoza: Acribia, 2002.
- FREITAS, Ana C.; FIGUEIREDO, Paulo, *Conservação de Alimentos*: Lisboa, 2000.
- HERITAGE, J.; EVANS, E. G.; KILLINGTON, R. A., *Microbiologia em Ação*. Coleção Ciência. Lisboa: Replicação, 2002.
- ICMSF(International Commission on Microbiological Specifications for Foods); *Microbial Ecology of Foods Vol I - Factors affecting life and death of microorganisms*; Academic Press, Inc.; San Diego; 1990
- JAY, J. M.; “Modern Food Microbiology”; 5 ed.; Chapman & Hall; New York; 1996
- LACASSE, D., *Introdução à Microbiologia Alimentar*; Instituto Piaget;Lisboa; 1995
- MATISSEK, R.; SCHNEPEL, F. M.; STEINER, G. *Análisis de los alimentos: Fundamentos, métodos, aplicaciones*. Zaragoza: Acribia, 1998.
- MOSS, M., O.; *Microbial Food Poisoning. In: Essays in Agricultural and Food Microbiology*, Norris, J., R. & Pettipher, G., L. (eds), New York, 1987.
- PELCZAR, M., REID, R. & CHAN, E.C.S.; *Microbiologia*. McGraw-Hill, Vol.1 e 2, S. Paulo, Brasil, 1980.
- PINTO, A, F., M., A.; Os Micróbios: As Super-Estrelas que o Homem Descobriu. *In: Viva a Ciência 94*, IPV, 1995.
- PINTO, A, F., M., A.; Papel dos Microrganismos na Produção e na Transformação de Alimentos. *Terra Fértil*, 1; 1996.
- PRESCOTT, L., M., HARLEY, J., P. & KLEIN, D., A.; *Microbiology*. Wm. C. Brown Publishers, 3ª edição, USA, 1996.
- SANTOS, I. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N., *Fungos Contaminantes na Indústria Alimentar*. Braga: Micoteca da Universidade do Minho, 1998.
- SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F., *Introducción a la Toxicología de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1996.
- VIEGAS, Sílvia J.; Alterações do estado de saúde associadas à alimentação - Contaminação Microbiológica dos Alimentos, Instituto de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2010.



<http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/index.html> - muitas informações e fotografias de vários microrganismos podem ser obtidas no Zoo dos Micróbios

<http://snirh.inag.pt/default.htm> <http://www.bacteriamuseum.org/niches/foodsafety/watersafety.shtml>

http://europa.eu.int/comm/environment/youth/water/index_pt.html <http://www.epa.gov/safewater/kids/>

<http://www.asm.org> - site com artigos e informação acerca da história da microbiologia

<http://www.e-escola.pt/ftema.asp?canal=biologia&id=71>

<http://www.magma.ca> - site com muita informação respeitante ao microscópio bem como um leque de inúmeras imagens de seres microscópicos

http://www.panalimentos.org/panalimentos_por/Educacion/educacion1.asp?cd=136&id=64

<http://activa.sapo.pt/belezaesaude/nutricao/2009/08/21/no-verao-proteja-se-contra-as-doencas-de-origem-alimentar2#ixzz1tzyQ4QmY>

<http://www.segurancalimentar.com/conteudos.php?id=30>



