

TRABALHO DE INVESTIGAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE ALGUNS TIPOS DE POPULAÇÃO
BACTERIANA EM RISSÓIS DE CARNE E DE PEIXE À
VENDA NA CIDADE DO PORTO**

**CURSO DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO DA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Helena Margarida Ávila Campos Marques

Porto 1993

AGRADECIMENTO

Gostaria de deixar uma palavra de profunda gratidão ao Prof. Dr. Freitas da Fonseca e ao Dr. Passos Gonçalves, por todo o apoio prestado durante a realização deste trabalho.



ÍNDICE

I - Introdução	4
II - Objectivos	5
III - Material e métodos	7
1 - Matérias primas	7
1.1 - Amostragem	7
1.2 - Método de colheita de amostras	8
1.3 - Parâmetros	8
1.3.1 - Microrganismos Aeróbios Mesófilos	9
1.3.2 - <i>Staphylococci</i>	9
1.3.3 - Coliformes totais	10
1.3.4 - Coliformes fecais	10
2 - Método de examinação	11
2.1 - Material	11
2.2 - Meios de cultura	12

2.3 - Técnica	13
2.3.1 - Preparação da amostra	13
2.3.2 - Diluição	14
2.3.3 - Sementeira	15
2.3.4 - Incubação	17
2.4 - Leitura	18
IV - Resultados	20
V - Discussão	22
VI - Conclusão	28
Bibliografia	29
Anexo	30



I - INTRODUÇÃO

O presente trabalho refere-se a um estudo realizado no Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

O produto escolhido para análise foi o rissol pronto a ser consumido. Esta opção foi tomada em virtude de este alimento ser bastante procurado nos estabelecimentos da cidade do Porto, de ser um produto que carece de muito manuseamento, e ainda, devido ao facto de não ser do conhecimento geral o nível de salubridade que este tipo de produto apresenta.

Como é sabido, quando não são cumpridas as mais elementares regras de higiene no manuseamento e na conservação dos produtos alimentares, estes podem tornar-se perigosos, visto que, se contaminados, é fácil a proliferação dos microrganismos (3).

Apesar do progresso da ciência e da tecnologia, a contaminação bacteriana dos alimentos é, hoje em dia, um dos maiores problemas de saúde mundial. As toxi-infecções alimentares são talvez o maior problema de saúde no mundo contemporâneo e uma importante causa na redução da produtividade económica. No entanto, só uma pequena percentagem dos casos chega ao conhecimento dos serviços de saúde e ainda menos é o número de casos investigados. Mesmo assim, os dados disponíveis indicam que toxi-infecções alimentares estão a aumentar no mundo inteiro (5).

Dado este conjunto de factores, parece-me ser oportuna a realização de um trabalho com estas características.

II - OBJECTIVOS

A qualidade do alimento é influenciada por múltiplos factores, entre os quais a higiene do equipamento, o ambiente - ar e água - , e pelo pessoal que manuseia directamente o produto (3). Por isso, não é objectivo deste trabalho identificar a proveniência dos microrganismos analisados, mas sim fazer um levantamento da qualidade microbiana e higiénica dos rissois à venda em estabelecimentos da cidade do Porto, depois de previamente embalados para serem consumidos no exterior do estabelecimento. Não foram assim efectuadas análises ao pessoal nem ao equipamento, até por impossibilidade prática de efectuar tais operações.

O número de amostras colhidas em cada ponto de amostragem não foi de cinco, como recomenda a FAO (2) , mas sim de uma, dado não ser comportável executar todas as análises, uma vez que foram efectuadas pela autora deste trabalho e também porque este número só seria necessário se se quisesse determinar a qualidade higiénica dos rissois fornecidos nesse preciso local.

Por razões que se prendem com a natureza e as implicações deste trabalho, não se referem os nomes dos estabelecimentos onde foram efectuadas as colheitas das amostras.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Matérias primas

1.1 - Amostragem

Para a realização deste trabalho, foram feitas recolhas em 36 estabelecimentos da cidade do Porto, num total de 59 amostras. A escolha dos locais foi aleatória, tentando-se, no entanto, demarcar zonas onde o consumo fosse provavelmente superior.

Destes 36 estabelecimentos, as colheitas foram divididas da seguinte forma : em cada um de 24 locais foi adquirido 1 rissol de carne e um rissol de peixe, enquanto que em 5 locais foi só recolhido 1 rissol de carne e noutros 6 , 1 rissol de peixe. Isto ficou a dever-se ao facto de nem todas as casas terem à venda ambas as variedades.

A denominação de rissol de carne e rissol de peixe é utilizada dado o rissol de carne poder ser de vitela, galinha, e o de peixe poder ser de camarão, berbigão, entre outros.

1.2 - Método de colheita de amostras

É de primeira importância que as amostras dos produtos para exame bacteriológico reflitam as condições microbiológicas, no momento da colheita das amostras.

Como o objectivo deste estudo é o de saber o estado higio-sanitário em que se encontram os rissóis que são adquiridos para consumir fora do estabelecimento (o que pressupõe a manipulação necessária para embalagem, pelo pessoal do estabelecimento), a técnica de colheita utilizada foi a seguinte: nos locais seleccionados para o efeito, era pedido um rissol de carne e um de peixe, ou só um dos dois, conforme o previamente descrito. De seguida era solicitado o seu embrulho em separado. As amostras eram então transportadas para o Serviço de Microbiologia, numa caixa térmica, para que não ocorresse variação da temperatura original.

Uma vez aí chegadas, cerca de 20 a 30 minutos após a colheita, as amostras foram imediatamente refrigeradas, sendo de seguida analisadas.

1.3 - Parâmetros

A prática utilizada durante muitos anos, e que continua a ser seguida, é a de determinar a qualidade higiénica dos alimentos pela presença de certos microrganismos indicadores (4). Entende-se por microrganismos indicadores, o grupo de microrganismos

cuja presença na comida, acima de certos limites numéricos, indica que o alimento foi exposto a práticas de higiene menos correctas, passíveis de poderem provocar toxinfecções alimentares e ainda de permitirem a proliferação de espécies patogénicas.(2) (4).

Assim, usaram-se como parâmetros microbiológicos dos produtos colhidos: Microrganismos Aeróbios Mesófilos, *Staphylococci*, Coliformes totais e Coliformes fecais.

1.3.1 - Microrganismos Aeróbios Mesófilos

Os Microrganismos Aeróbios Mesófilos não estão necessariamente relacionados com a qualidade bacteriológica dos alimentos, visto muitos patogénicos não crescerem com as condições de cultura utilizadas. No entanto, é frequentemente usado como indicador padrão de higiene e temperatura empregue na preparação, distribuição e armazenamento dos alimentos (1).

1.3.2 - *Staphylococci*

A presença destes microrganismos na comida é, geralmente, originária da pele, boca e fossas nasais dos manipuladores de alimentos. A presença de um elevado número de *Staphylococci* é, geralmente, um bom indicador de que a higiene e a temperatura utilizada não foi adequada (2).

Estes microrganismos são capazes de crescer num meio com uma elevada percentagem de cloreto de sódio (7), como é o caso dos rissóis.

1.3.3. - Coliformes totais

O grupo dos coliformes contém espécies cujo habitat é o intestino e outros cujo habitat pode ser o solo ou a água. São indicadores úteis de processamento e higiene insatisfatórios, visto a sua presença em largo número nos alimentos indicar que pode ter ocorrido oportunidade para a proliferação, permitindo a multiplicação de outros microrganismos.(1) (2).

1.3.4 - Coliformes fecais

A sua presença nos alimentos tem sempre uma conotação de falta de higiene. O termo Coliformes fecais é relativamente recente e surgiu da necessidade de encontrar métodos que rapidamente indicassem a presença de *Escherichia coli* ou espécies com ela relacionadas, sem haver necessidade de se obterem culturas puras e utilizar o método IMViC. Os Coliformes fecais são considerados todos aqueles de entre os Coliformes totais que são capazes de crescer e de fermentar a lactose a temperaturas superiores ao normal, ou seja, acima de $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estes comportam na sua maior parte *Escherichia coli* e são usados como indicadores de uma provável contaminação de origem fecal (2).

2 - Método de examinação

2.1 - Material

O material utilizado para a realização deste trabalho foi o seguinte:

- Pipetas de 1 ml graduadas, de escoamento total
- Placas de Petri
- Almofarizes
- Balões de Erlenmeyer
- Pinças
- Balança electrónica de precisão
- Banho-Maria regulado para 45 °C +/- 1 °C
- Contador de colónias
- Incubadoras: 30 °C +/- 1 °C
- 37 °C +/- 1 °C
- 44 °C +/- 1 °C

2.2 - Meios de cultura

Os meios de cultura foram seleccionados de acordo com os usados no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Assim, foram utilizados os seguintes meios:

Quadro 1 : Meios de cultura utilizados

Microrganismos indicadores	Meio de cultura
Microrganismos Aeróbios Mesófilos	Plate Count Agar (PCA) ou Glucose Tryptone Yeast Extract Agar
<i>Staphylococci</i>	Bacto Manitol Salt Agar
Coliformes totais	Bacto Brilliant Green Bile 2%
Coliformes fecais	Bacto Brilliant Green Bile 2%

Como diluente, foi utilizado Água Peptonada.

2.3 - Técnica

2.3.1 - Preparação da amostra

Colocou-se o almofariz previamente esterilizado no prato da balança, sendo de seguida introduzido o rissol (*Fot. 1*). Anotou-se o seu peso. De modo a permitir homogeneizar melhor a amostra, adicionou-se uma pequena quantidade de água peptonada quantificada (*Fot. 2*). Procedeu-se então à homogeneização, com a ajuda de um pilão (*Fot. 3*). Após esta operação, foi colocado novamente o almofariz na balança.

Estas operações foram efectuadas com todos os cuidados de assépsia.



Fot. 1



Fot. 2



Fot. 3

2.3.2 - Diluição

De seguida, foi retirado do almofariz , com a ajuda de uma pinça esterilizada, uma quantidade, pesada, do homogeneizado (*Fot. 4*) e introduzida num balão contendo 50 ml de água peptonada (*Fot. 5*).

O balão foi então mexido com movimentos circulares de modo a permitir uma melhor mistura (*Fot. 6*).



Fot.4



Fot.5



Fot.6

2.3.3 - Sementeira

Após a preparação da amostra e das diluições, a sementeira por *shake*, foi executada do seguinte modo:

Pipetou-se (Fot. 7) uma quantidade definida da diluição (Quadro 2) a analisar para um tubo de ensaio contendo 10 ml do meio (Fot. 8), que foi previamente fundido em Banho-Maria e estabilizado à temperatura de 45 - 50 °C, homogeneizando em seguida com movimentos cuidadosos de modo a evitar a formação de bolhas de ar e assegurar uma mistura homogênea.

Verteu-se o conteúdo do tubo de



Fot. 7



Fot. 8

ensaio para uma Placa de
Petri (Fig. 9).



Fot. 9

Quadro 2 : Quantidades de diluição utilizadas na sementeira

Microrganismos indicadores	Quantidade pipetada (ml)
Microrganismos Aeróbios Mesófilos	0,1 *
<i>Staphylococci</i>	1
Coliformes totais	1
Coliformes fecais	2

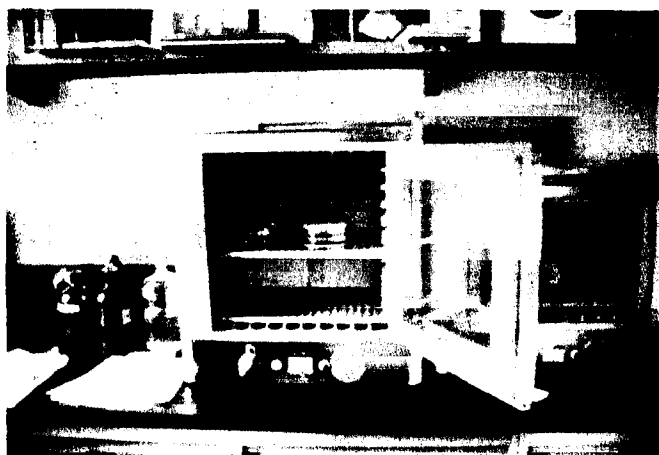
* Após a solidificação do agar, colocou-se uma segunda camada de 5 ml de Plate Count Agar, com a finalidade de impedir o desenvolvimento de colónias invasoras.

2.3.4 - Incubação

As placas foram colocadas nas respectivas incubadoras (Fot. 10 e 11), em " posição de incubação ", nas seguintes condições:

Quadro 3 : Condições de incubação

Microrganismo indicador	Temperatura de incubação (°C)	Período de incubação (h)
Microrganismos Aeróbios Mesófilos	30 °C	72
<i>Staphylococci</i>	37 °C	24
Coliformes totais	30 °C	24
Coliformes fecais	44 °C	24



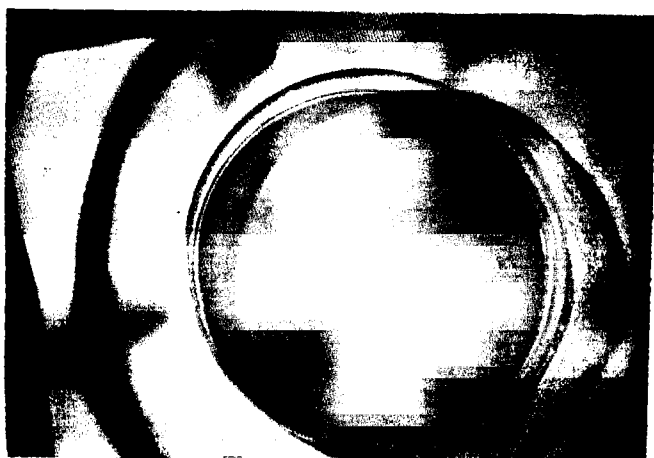
Fot. 10



Fot. 11

2.4 - Leitura

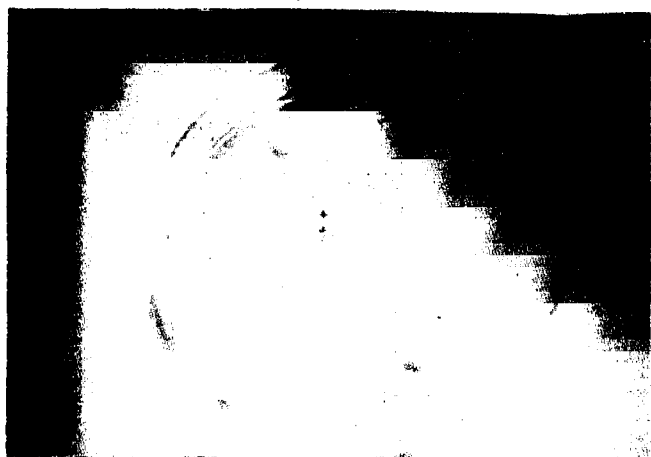
A contagem foi executada, ao fim dos tempos de incubação previamente estabelecidos, com o auxílio de um contador de colónias, e tendo como pressuposto que os microrganismos presentes numa amostra misturada com agar, formam colónias visíveis e separadas (*Fot. 12, 13, 14 e 15*): unidades formadoras de colónias (u.f.c.) (2).



Fot. 12



Fot. 13



Fot. 14



Fot. 15

IV - RESULTADOS

1 - Microrganismos Aeróbios Mesófilos

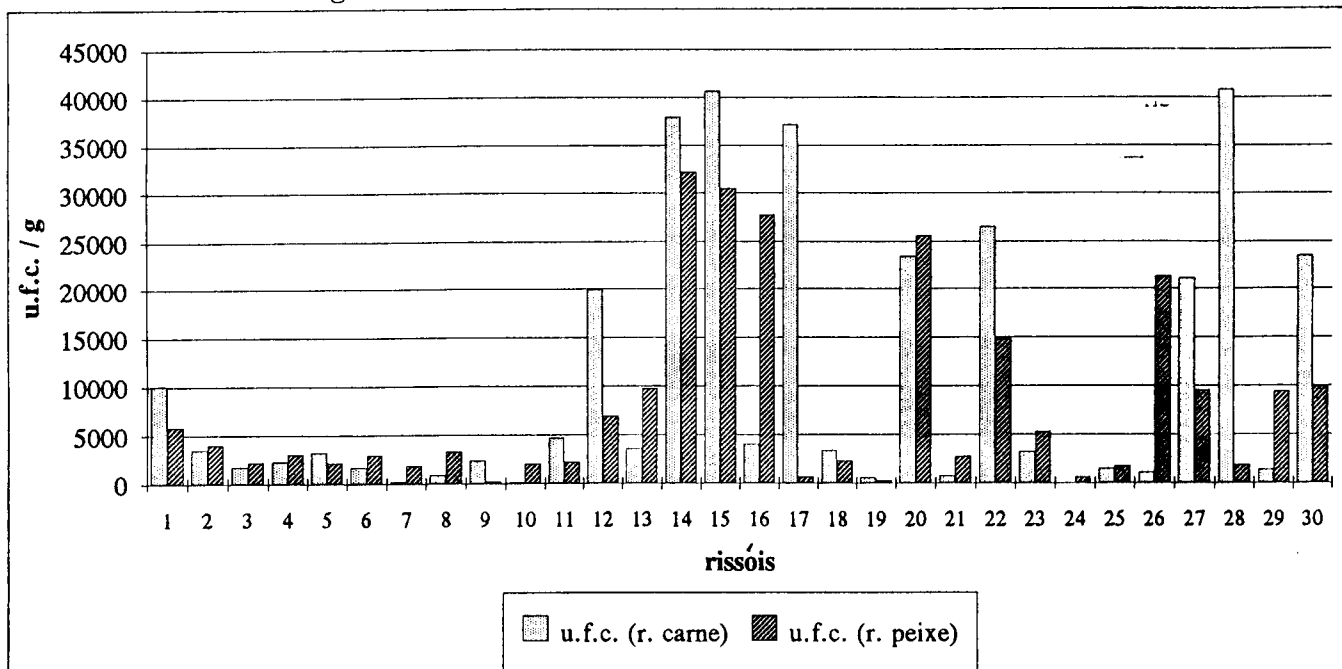


Gráfico 1 : Microrganismos presentes nos rissóis de carne e de peixe.

2 - Staphylococci

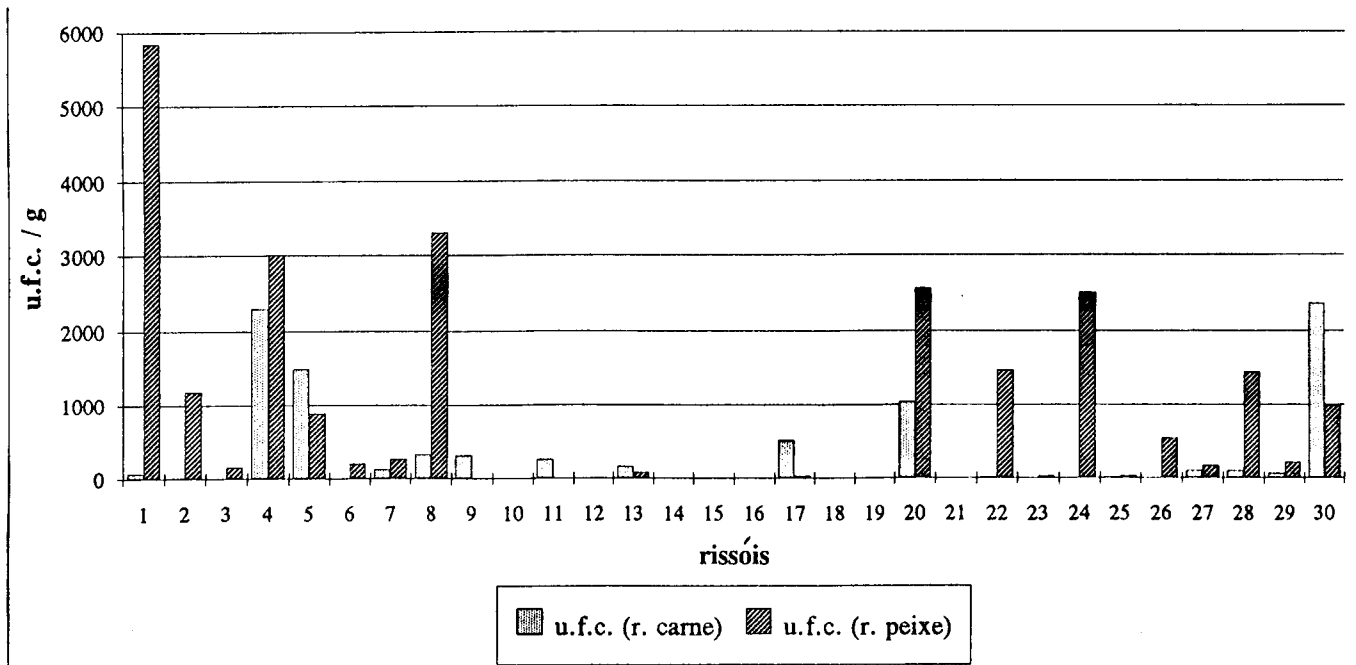


Gráfico 2 : Microrganismos presentes nos rissóis de carne e de peixe.

3 - Coliformes totais

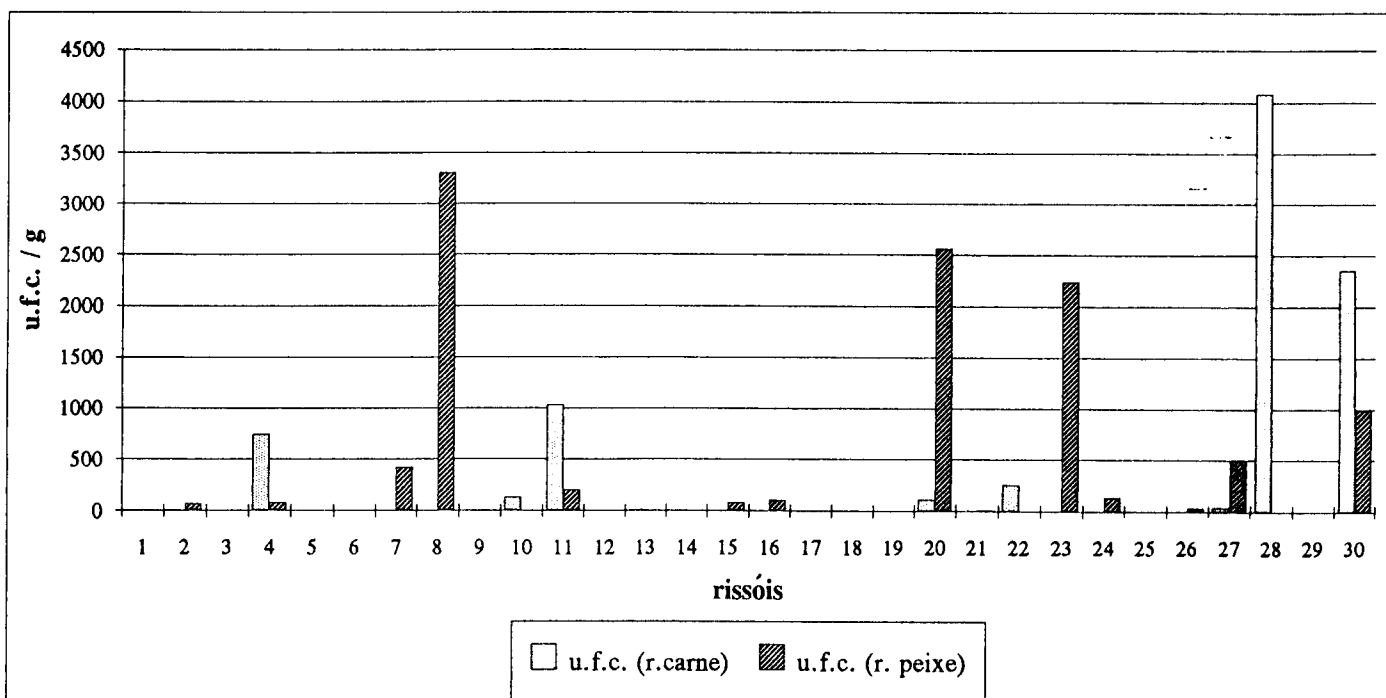


Gráfico 3 : Microrganismos presentes nos rissóis de carne e de peixe.

4 - Coliformes fecais

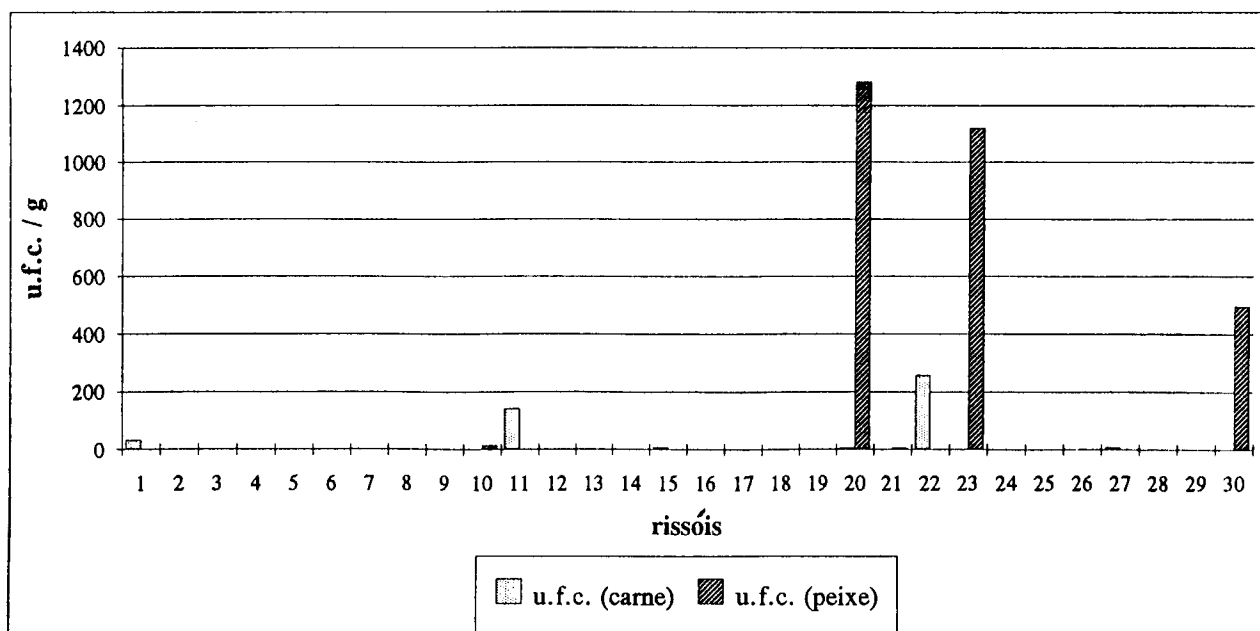


Gráfico 4 : Microrganismos presentes nos rissóis de carne e de peixe.

V - DISCUSSÃO

1 - Os valores médios, aproximados, de microrganismos presentes nos rissóis, por grama de amostra, foram os seguintes:

1.1 - Microrganismos Aeróbios Mesófilos

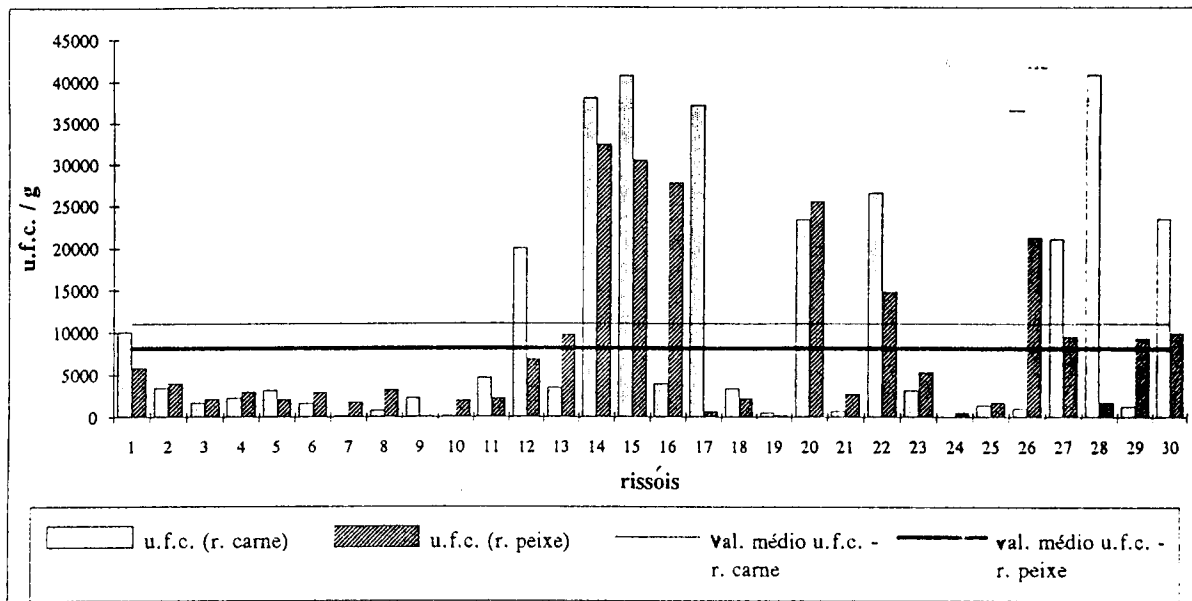


Gráfico 5 : Valor médio de microrganismos presentes nos rissóis.

1.2 - Staphylococci

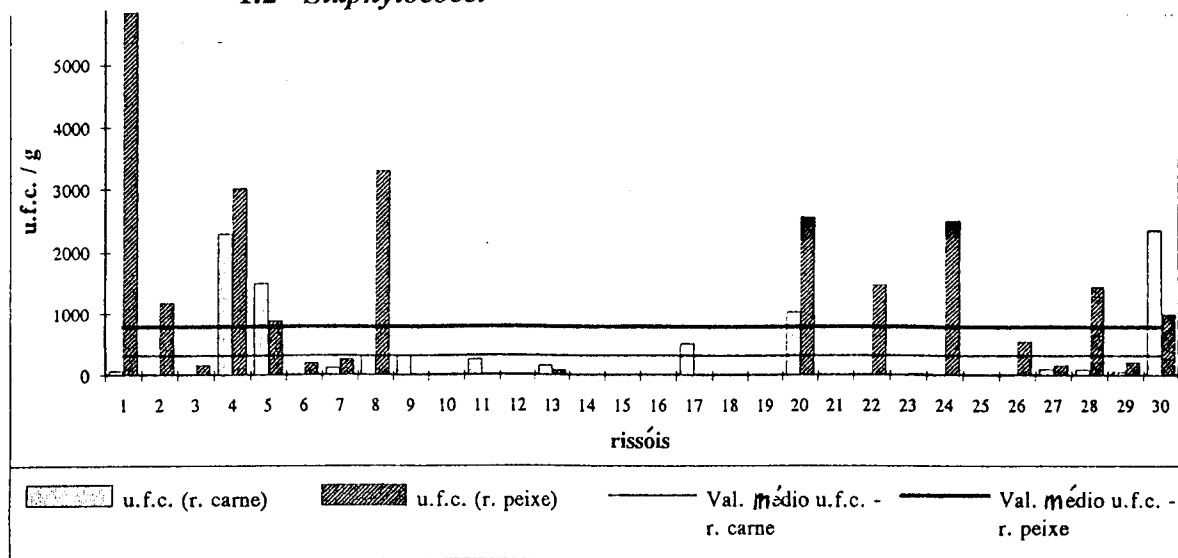


Gráfico 6 : Valor médio de microrganismos presentes nos rissóis.

1.3 - Coliformes totais

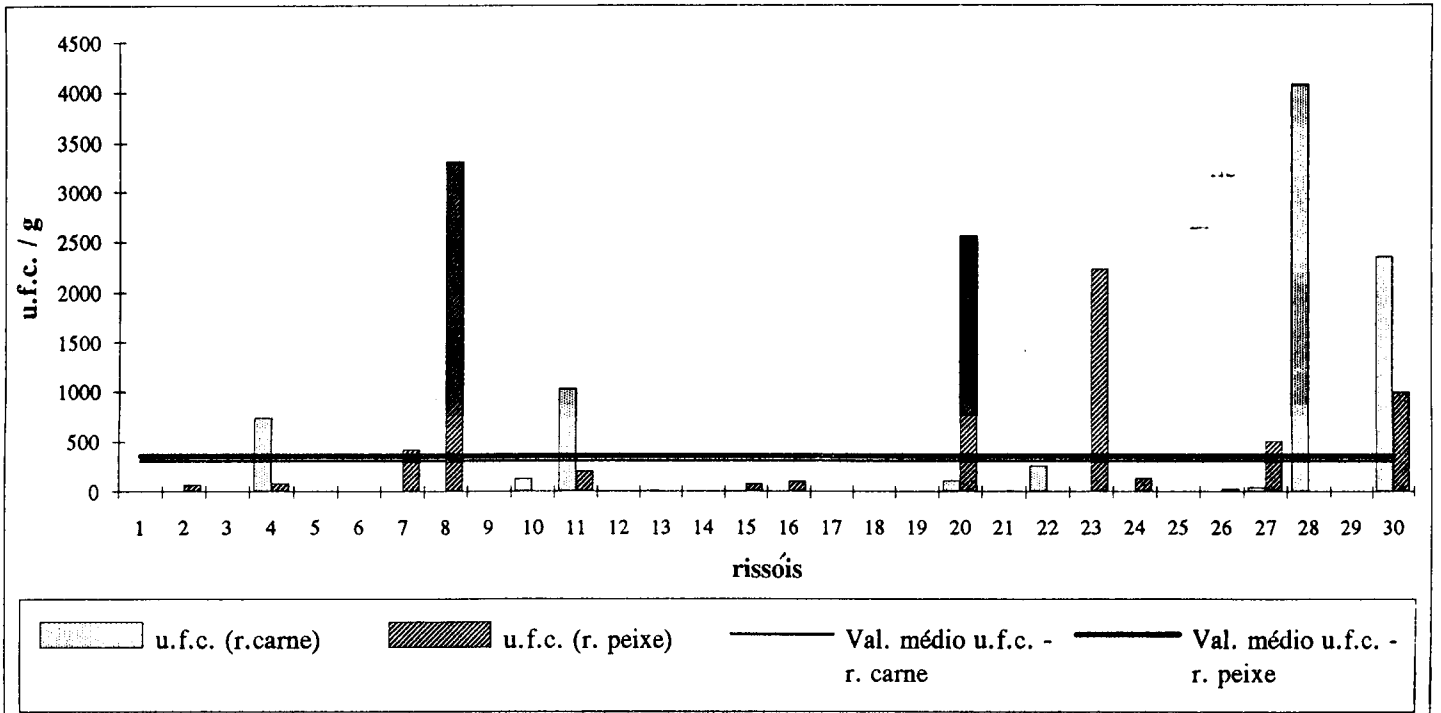


Gráfico 7 : Valor médio de microrganismos presentes nos rissóis.

1.4 - Coliformes fecais

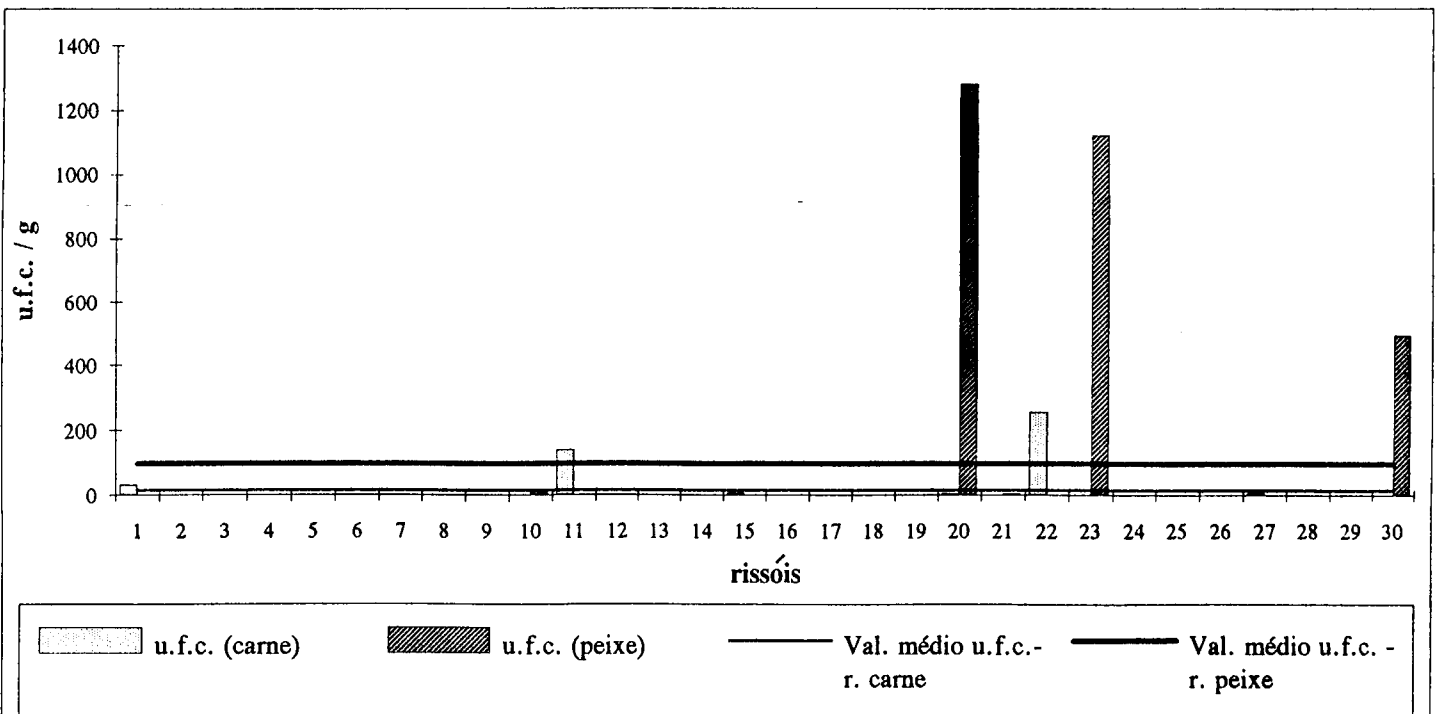


Gráfico 8 : Valor médio de microrganismos presentes nos rissóis.

2 - Dos rissóis analisados, e em relação a cada um dos microrganismos indicadores, a comparação estabelecida com os "Parâmetros para apreciação microbiológica dos alimentos pronto a comer" do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) (anexo 1), é o seguinte:

2.1 - Microrganismos Aeróbios Mesófilos

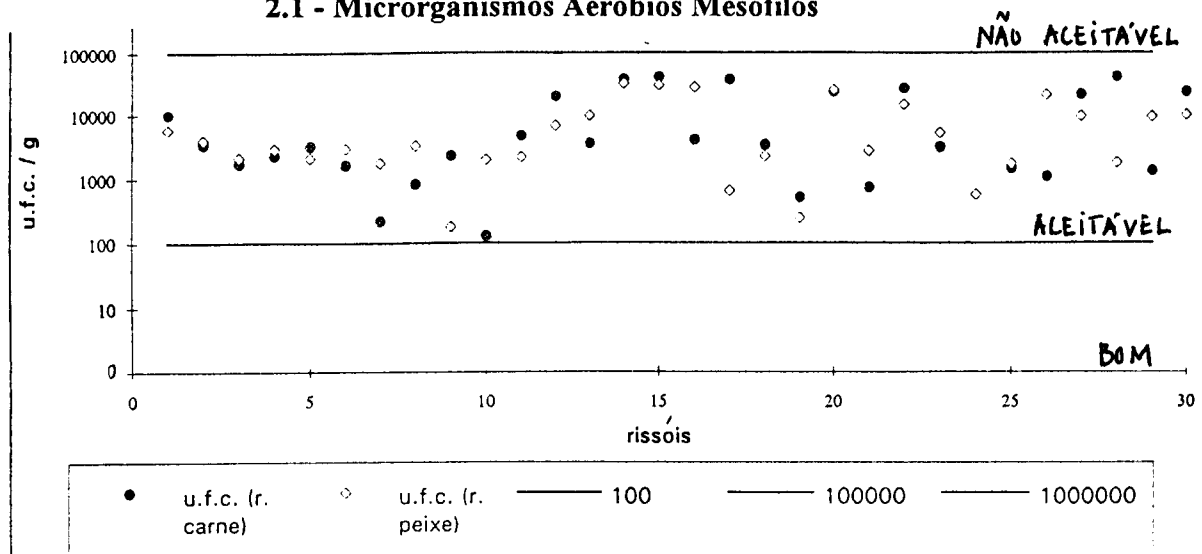


Gráfico 9 : Microrganismos presentes nos rissóis.

2.2 - Staphylococci

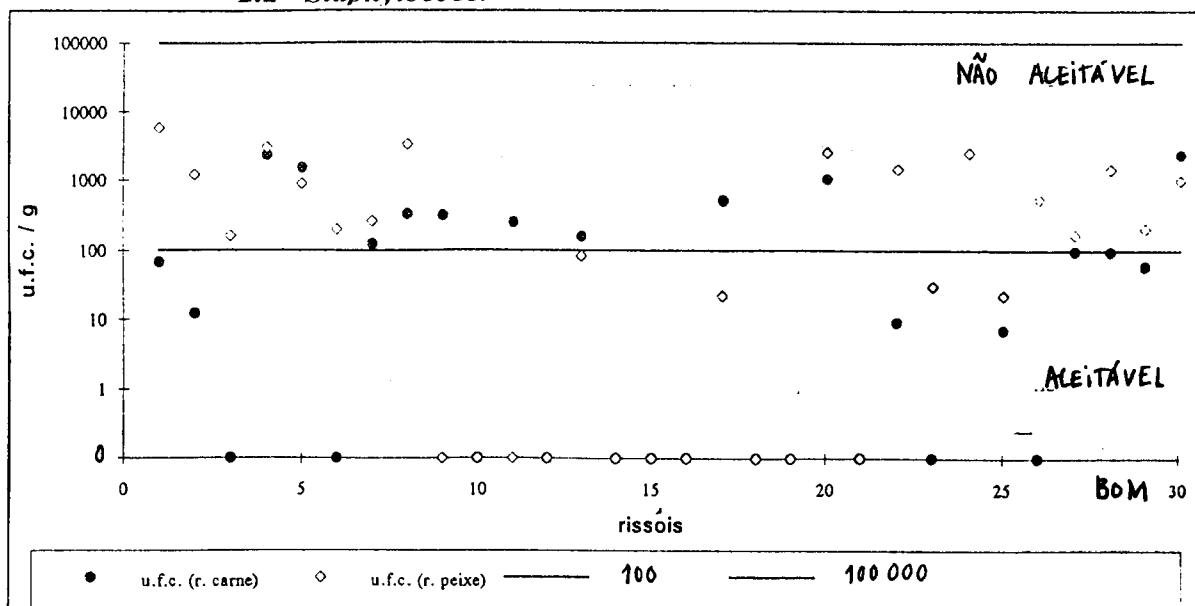


Gráfico 10 : Microrganismos presentes nos rissóis.

2.3 - Coliformes totais

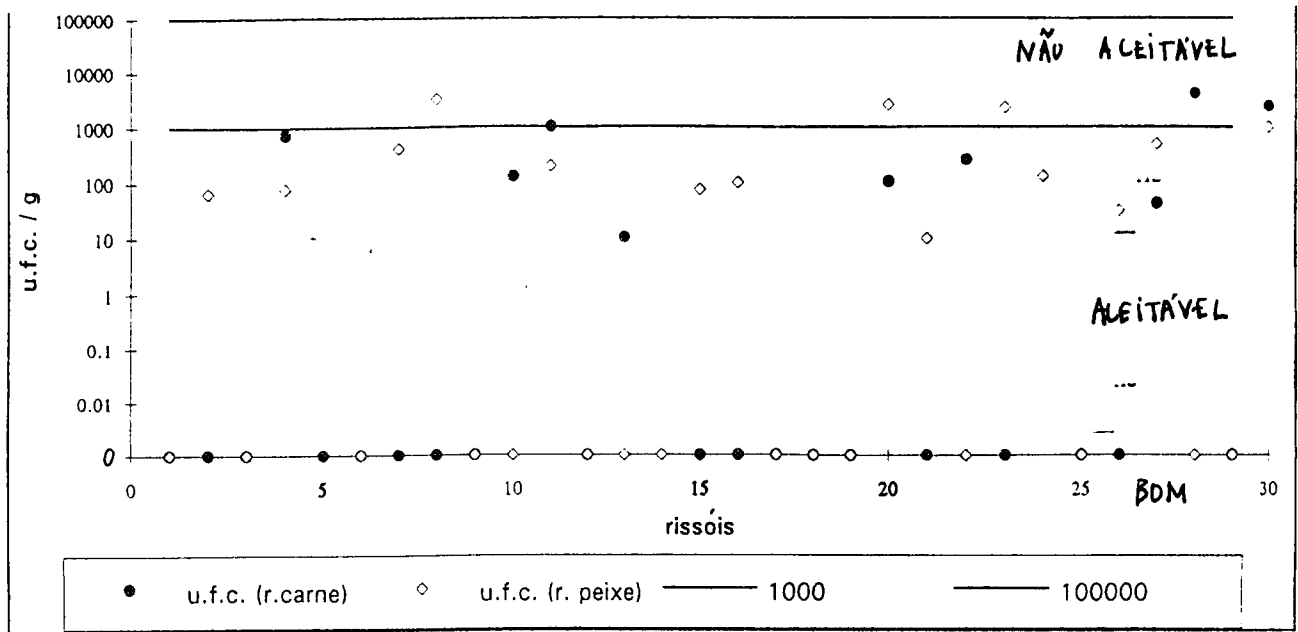


Gráfico 11 : Microrganismos presentes nos rissóis.

2.4 - Coliformes fecais

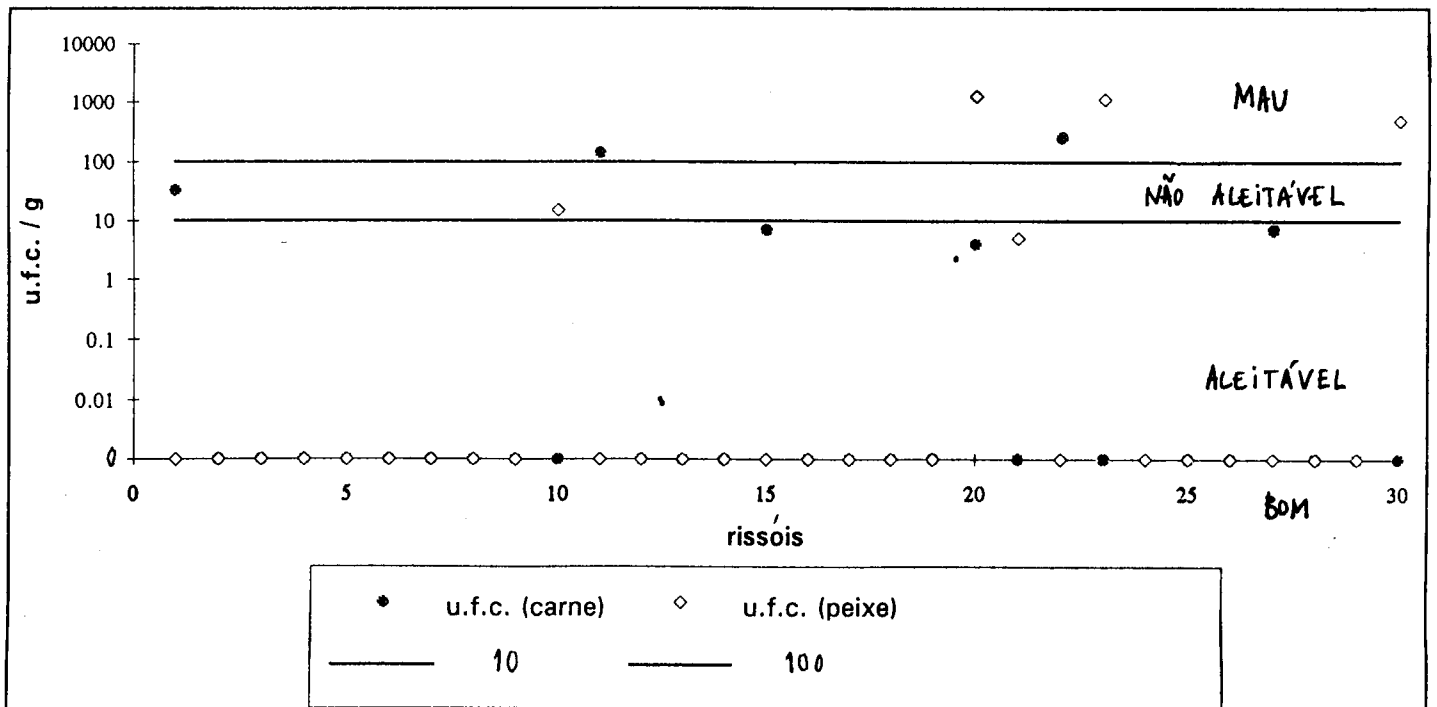


Gráfico 12 : Microrganismos presentes nos rissóis.

Tendo em conta que na cidade do Porto existem cerca de 300 estabelecimentos deste género (6) , considera-se que a amostra é representativa de cerca de 12 % dos locais.

A salubridade dos rissóis depende em longa escala onde é adquirido, como se pode verificar pelos gráficos apresentados (Gráfico 1, 2, 3 e 4), não se podendo por isso dizer que é indiferente o local onde é feita a sua aquisição.

De qualquer modo, verifica-se que, quanto a valores médios, a probabilidade de se encontrar um rissol com valores mais elevados de microrganismos analisados, é maior nos rissóis de peixe, excepto no que diz respeito aos Microrganismos Aeróbios Mesófilos. (Gráfico 5, 6, 7, e 8).

Na comparação com os "Parâmetros para apreciação microbiológica de alimentos prontos a comer", do INSA, constata-se que as percentagens são as seguintes:

Microrganismos Aeróbios Mesófilos

-Mau :	0%
-Não aceitável:	47,6%
-Aceitável:	52,4%
-Bom:	0%

Staphylococci

-Mau:	11,9%
-Não aceitável:	32,2%
-Aceitável:	18,6%
-Bom:	37,3%

Coliformes totais

-Mau:	0%
-Não aceitável:	8,5%
-Aceitável:	33,9%
-Bom:	57,6%

Coliformes fecais

-Mau:	8,5%
-Não aceitável:	3,4%
-Aceitável:	6,8%
-Bom:	81,3%

Deste modo, é de assinalar que, fazendo a soma dos parâmetros "mau" e "não aceitável", a percentagem de rissóis com estes valores é de aproximadamente 48%, 44%, 9% e 12%, respectivamente para Microrganismos Aeróbios Mesófilos, *Staphylococci*, Coliformes totais e Coliformes fecais.

VI - CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou-me pôr em prática algumas das noções adquiridas durante a frequência do Curso de Ciências da Nutrição.

Proporcionou-me ainda adquirir alguma prática de investigação laboratorial, trabalho este que se revela fascinante.

Embora tenham havido algumas limitações ao desenvolvimento deste trabalho, penso que os objectivos propostos foram alcançados.

Após a realização deste trabalho, constatei que existem dados suficientes para o prosseguir, numa outra área, visto os valores encontrados de pesos, em gramas, dos rissóis serem muito diferentes.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Harrigan, W.F. e Park R.W..Making safe food. A manegement guide for microbiological quality. Academic Press, 1991
- 2 - FAO. Food and nutrition paper. Manual of good quality control.4 Microbiological analysis, 1979
- 3 - Frazier, W. C., Food Microbiology, 2ª edição, 1967
- 4 - Jay, James M..Modern food microbiology, Second edition, 1978
- 5 - WHO. WHO Commission on health and environment. Report of the panel on food and agriculture, Gêneve, 1992.
- 6 - Páginas amarelas, Região Porto - Lista Telefónica Nacional. - Telefones de Lisboa e Porto, SA 1992-1993
- 7 - Brock, Thomas D. Basic Microbiology with applications. Prentice-Hall, 1986.

ANEXO

Parâmetros para apreciação microbiológica de alimentos prontos a comer (INSA-93/02/04)

	BOM	ACEITÁVEL	NÃO ACEITÁVEL	MAU
Nº de bactérias aeróbias mesófilas	$\leq 10e2$ /g	$> 10e2 \leq 10e5$ /g	$> 10e5 \leq 10e6$ /g	$> 10e6$ /g
Nº de bolores e de leveduras	< 10 /g	$> 10 \leq 10e3$ /g	$> 10e3$ /g	
Nº de coliformes totais	0/g	$> 0 \leq 10e3$ /g	$> 10e3 \leq 10e5$ /g	$> 10e5$ /g
Nº de coliformes fecais e E.coli	0 /g	$> 0 \leq 10$ /g	$> 10 \leq 10e2$ /g	$> 10 e2$ /g
Nº de estreptococos fecais	0/g	$> 0 \leq 10e3$ /g	$> 10e3 \leq 10e5$ /g	$> 10e5$ /g
Nº de esporos de anaeróbios sulfito redutores	0/g	$> 0 \leq 10e2$ /g	$> 10 e2$ /g	
Nº de <i>Staphylococcus aureus</i>	0/g	$> 0 \leq 10e2$ /g	$> 10e2 \leq 10e5$ /g	$> 10e5$ /g
Nº de <i>Bacillus cereus</i>	0/g	$> 0 \leq 10e2$ /g	$> 10e2 \leq 10e6$ /g	$> 10e6$ /g

Em vigor no INSA-Porto a partir de 93/03/01