



CURSO TÉCNICO EM BIOQUÍMICA

**ÉRIKA RODRIGUES DA SILVA
LUIDY KAZUO ISSAYAMA
TALITA FERREIRA PIFFER ALVES**

**CATEGORIA 6: SEGURANÇA E SAÚDE
SEGURANÇA ALIMENTAR**

CAMPINAS - SETEMBRO

2011

Érika Rodrigues da Silva
Luidy Kazuo Issayama
Talita Ferreira Piffer Alves

SEGURANÇA ALIMENTAR

Relatório do Projeto apresentado como exigência para a 5ª Feira Tecnológica do Centro Paula Souza - FETEPS 2011, na Área de Bioquímica, Categoria 6 – Segurança e Saúde, sob a Orientação das Professoras Erica Gayego Bello Figueiredo Bortolotti e Mariangela C. Grippo.

CAMPINAS - SETEMBRO

2011

DEDICATÓRIA

Dedicamos este trabalho àqueles que acreditaram em nossas idéias e na capacidade de executá-las e aos nossos queridos amigos e companheiros Adson Mettler do Nascimento e Drielly Francisco de Almeida.

AGRADECIMENTOS

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que o projeto fosse realizado, principalmente as orientadoras Erica G.B.F Bortolotti, Mariangela C.Grippo e a Professora Mara Simi Rossin, por terem sanado nossas dúvidas e nos auxiliado na execução do projeto, bem como aos nossos familiares e amigos que suportaram e nos apoiaram nos momentos difíceis e a Deus por ter nos dado essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
1. INTRODUÇÃO.....	07
2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	07
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	09
4. RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	13
5. HIPÓTESE.....	13
6. OBJETIVOS.....	13
7. MATERIAIS	14
8. CUSTOS.....	15
9. MÉTODOS.....	16
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
11. CONCLUSÃO	24
12. PERSPECTIVAS	25
13. BIBLIOGRAFIA.....	25
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
15. APÊNDICES	27
15. 1. CRONOGRAMA.....	28
15. 2. QUESTIONÁRIO.....	28
15. 3. RESULTADOS DAS COLETAS 1 E 2.....	28
15. 4. TERMOS DE CONSENTIMENTO E AUTORIZAÇÕES.....	31

RESUMO

Este projeto buscou, através de análises microbiológicas, estabelecer um parâmetro sobre qual a maior fonte de contaminação, alimento (Doença Transmitida por Alimento-DTA's) ou indivíduo (higiene pessoal). A metodologia adotada consistiu em observar e coletar amostras biológicas (das mãos das crianças) e alimentícias em uma creche do município de Campinas-SP. A coleta do material biológico a ser analisado, foi feita de maneira não invasiva (coletadas com swabs) e com autorização da direção da creche e dos pais (ou responsável legal) das crianças. As amostras biológicas foram coletadas momentos antes da refeição das crianças e as amostras alimentícias, após as crianças terem se servido. Nas análises foram utilizados métodos para contagem e identificação de microorganismos como: obtenção de culturas puras, coloração de Gram, placas com meios seletivo-diferenciais e espalhamento. De acordo com os resultados obtidos, o indivíduo demonstrou ser uma importante fonte de contaminação. Nesse contexto, o estudo teve como objetivo final a conscientização sobre a importância da higiene desde o prepara do alimento até o momento do consumo, demonstrando não só para o público alvo, mas também para a comunidade da qual o mesmo faz parte, a importância da abordagem de assuntos tão benéficos para a saúde pública como é o caso da segurança alimentar.

PALAVRAS-CHAVE: *segurança alimentar; higiene; doença transmitida por alimentos (DTA's); análises microbiológicas.*

1. INTRODUÇÃO

Crianças em idade pré - escolar da Cemei Aparecida Cassiolato, localizada no município de Campinas à Rua Ouro Fino 23 no Jardim Santa Mônica, passaram por observação comportamental e análises microbiológicas onde se verificou os tipos (morfologia) de microorganismos, presentes nas mãos das crianças e nos alimentos consumidos por elas, que podem estar associados a uma Doença Transmitida por Alimento (DTA's).

A coleta do material biológico a ser analisado, foi feita de maneira não invasiva e com autorização da direção da creche e dos pais (ou responsável legal) das crianças (termos de consentimento no anexo). Foram aplicadas técnicas de microbiologia como as de: coloração, contagem, diferenciação e seleção necessárias para identificação dos microorganismos encontrados nas amostras tanto biológicas (amostra das mãos das crianças) como alimentícias.

As amostras biológicas foram coletadas momentos antes da refeição das crianças. As amostras alimentícias foram coletadas pouco após as crianças terem se servido.

Nesse contexto o estudo teve como objetivo final a conscientização sobre a importância da higiene desde o prepara do alimento até o momento do consumo. Demonstrando não só para o público alvo, mas também para a comunidade da qual o mesmo faz parte, à importância da abordagem de assuntos tão benéficos para a saúde pública como é o caso da segurança alimentar, já que a partir dos resultados obtidos foi possível observar a influência da higiene na quantidade e variedade dos microorganismos encontrados principalmente nas mãos das crianças.

Esse projeto caracteriza uma pesquisa descritiva⁽¹⁾, pois apresenta como objetivos a descrição das características de um fenômeno ou de uma experiência. A diferença em relação à pesquisa exploratória é que o assunto pesquisa já é conhecido. A grande contribuição das pesquisas descritivas é proporcionar novas visões sobre uma realidade já conhecida. ⁽¹⁾

2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Segundo pesquisa do Ministério da Saúde, de 1999 a 2007, ocorreram 5.699 surtos de doenças transmitidas por alimentos. Foram afetadas 114.302 pessoas e registradas 61 mortes. O levantamento identificou que as bactérias foram as grandes vilãs, responsáveis por 83,5% (2.366) de quase metade dos surtos. Em segundo lugar, ficaram os vírus (14,1%)

e, em seguida, os produtos químicos (1,3%). Outros 2.865 surtos (50,2%) não tiveram as causas identificadas. ⁽²⁾

Dados do estudo mostram que cerca de 870 dos surtos foram provocados por alimentos com ovos crus ou mal cozidos. A maionese caseira é a campeã em danos à saúde das pessoas. Os mistos- pratos com ingredientes de origem animal e vegetal - foram responsáveis por 666 ocorrências e as carnes vermelhas por outros 450 surtos. O Ministério da Saúde alerta que a notificação à Vigilância Sanitária permitirá identificar o produto contaminado que afetou a pessoa. ⁽²⁾

A pesquisa identificou que 1.979 surtos foram pelo consumo de alimentos em residência, contra 22 por ingestão de produtos vendidos por ambulantes, o que não significa que a comida caseira seja mais nociva que a da rua. Um dos fatores que podem comprometer a qualidade da comida e afetar a saúde do consumidor é o tempo em que a comida levou para chegar à residência e em quais condições. ⁽²⁾

Para que esses números sejam reduzidos é necessário que o hábito da notificação se dissemine em todo o país. De acordo com a pesquisa os estados do Sul e Sudeste - Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente - são os que mais informam à vigilância epidemiológica sobre os surtos de doenças transmitidas por alimentos. No Nordeste, o destaque fica para Pernambuco. ⁽³⁾

Pesquisas revelam também que 27% dos casos de intoxicação alimentar estão associados ao consumo de alimentos contaminados dentro de casa. Bares, padarias e restaurantes somam um total de 24%. Já creches, escolas, asilos e outros incidem em 39%. E os 10% restantes são casos não identificados. ⁽⁴⁾

A razão que explica esse resultado é a falta de cuidado durante o preparo, conservação e armazenamento dos alimentos, em que a contaminação por microorganismos ocorre pela falta de conhecimento sobre como manipular e conservar corretamente o alimento. ⁽⁵⁾

As intoxicações alimentares podem causar problemas bem mais graves do que diarreia e vômitos. A longo prazo, as intoxicações alimentares podem causar complicações graves como insuficiência renal, paralisia, convulsões e deficiências auditivas e até visuais. Estas conseqüências foram reveladas por um relatório publicado pelo Centro de Prevenção e Investigação de Doenças Transmitidas por Alimentos (EUA), com o apoio dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC's). O relatório realça que 3% das vítimas de intoxicações alimentares podem ter graves problemas de saúde no futuro. Nos EUA, onde o registro das doenças alimentares é muito mais eficiente, estima-se que 76 milhões de pessoas sofram intoxicações alimentares a cada ano. De acordo com os CDCs, pelo menos,

325 mil pessoas são hospitalizadas e 5.000 acabam por não resistir, tendo metade das vítimas menos de 15 anos.⁽⁶⁾

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Segurança Alimentar

Segundo a Declaração de Roma, emitida ao final da cúpula Mundial de Alimentação, em novembro de 1996 o conceito de Segurança Alimentar é tido como alimento disponível em todo momento, aos quais todas as pessoas têm acesso adequado em termos nutricionais (quantidade, qualidade e variedade) e aceitáveis em cada contexto cultural. A preocupação com a segurança alimentar e o direito à alimentação saudável vem crescendo bastante inclusive no Brasil onde o Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (CONSAN) em recente relatório divulgou alguns marcadores que indicam os avanços e os desafios na consagração da segurança alimentar no país.⁽⁷⁾

A disponibilidade de alimento é um direito do ser humano garantido por lei, é nesse sentido principalmente que varias medidas estão sendo criadas pelo poder público para assegurar que a segurança alimentar se instaure. No entanto a simples disponibilidade de alimento não garante a segurança alimentar, já que para se alcançá-la é preciso que esse alimento esteja disponível em termos nutricionais adequados como: variedade, quantidade e qualidade. A qualidade desse alimento por sua vez esta relacionada direta e indiretamente com as condições sanitárias nas quais eles são produzidos, transportados, armazenados, preparados e consumidos.⁽⁷⁾

Como ponto mais importante e relevante desse conceito tão abrangente que é a segurança alimentar, foi adotado somente a qualidade do alimento como fator a ser estudado, a qual está estritamente ligada ao fato de existir ou não contaminantes que podem ser de origem diversas (sintética, viva, mineral, orgânica, inorgânica etc). Baseado neste ponto, é que foram feitas análises microbiológicas para detectar a presença de microorganismos que prejudiquem a qualidade do alimento e possam vir a causar uma DTA.⁽⁷⁾

No entanto diversos fatores também são cruciais para que a segurança alimentar possa de fato existir, um deles é a higiene tanto dos manipuladores de alimentos quanto dos consumidores do mesmo (que foram denominados indivíduos).

Geralmente vincula-se uma doença transmitida por alimentos (DTA) a qualidade “direta” do alimento, mas muitas vezes o alimento é contaminado no ato da alimentação pelo indivíduo, cuja higiene antes da refeição não foi adequada (quando esta existiu), portanto as

boas práticas de higiene pessoal são uma medida de prevenção que colabora com a segurança alimentar. ⁽⁸⁾

As DTA's representam um problema para saúde pública mundial, apesar dos constantes esforços para a melhoria da qualidade e segurança dos alimentos. ⁽⁹⁾

Entre os fatores que prejudicam a coleta de informações sobre as DTA's estão a troca de governos e a demissão dos servidores treinados para exercer a vigilância epidemiológica. ⁽³⁾

Os microrganismos causadores de enfermidades transmitidas por alimentos podem ser liberadores de toxina como: *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, fungos filamentosos; ou causadores de infecções: *Salmonella* sp, *E. coli*, *Shigella* sp, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campilobacter* sp, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* sp, entre muitos outros. ⁽¹⁰⁾

A descoberta da espécie e biótipo de microorganismo depende da realização de uma série bioquímica que avaliará através de meios específicos (ou outros métodos) alguns pontos relativos ao metabolismo, comportamento e preferência nutricional do patógeno em questão. ⁽¹¹⁾

As informações preventivas são uma importante estratégia para a redução de casos de DTA. As ações educativas sobre higiene alimentar podem e precisam ser realizadas em diferentes ambientes, como escolas, domicílios e unidades de saúde, para que a população de um modo geral passe não só a notificar os casos de toxifecção alimentar, mas aprenda a evitá-los praticando e cobrando as boas práticas de higiene nos cuidados com o alimento.

Foram estudados e pesquisados os microorganismos presentes nas mãos do público alvo e nos alimentos consumidos pelo mesmo; a partir dos resultados das análises foi aberta a discussão sobre qual é a fonte com maior potencial de contaminação: alimento ou indivíduo.

3.2. Os principais Agentes etiológicos de doenças de origem alimentar

A *Salmonella* é um gênero da família Enterobacteriaceae. São gram-negativas anaeróbias facultativas, morfologicamente denominadas como bacilos que não formam esporos, sendo que a maioria é móvel, com flagelos peritríquios (por toda a célula). Existem somente duas espécies de *Salmonella* (*S. entérica* e *S. bongori*), no entanto o gênero *Salmonella* possui cerca de 2.324 linhagens diferentes conhecidas como sorotipos ou sorovares. São sintomas de salmonelose de origem alimentar diarreia, náusea, dor abdominal, febre e calafrios, esporadicamente podem surgir vômitos, dor de cabeça e fraqueza. Essas bactérias vão penetrar no epitélio do intestino delgado e se multiplicar o que

induz a uma resposta inflamatória. A febre tifóide e doenças assemelhadas são causadas por dois sorotipos da *Salmonella* a *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B e C, essa doença tem uma taxa de fatalidade de 10%, já as outras salmoneloses tem menos de 1%. Em todos os casos de salmoneloses o indivíduo excreta através das fezes grandes quantidades do microorganismo. ⁽¹⁸⁾

A *Staphylococcus aureus*, é uma bactéria gram-positiva anaeróbia facultativa não formadora de esporos na forma de cocos dispostos em cachos (estafilococos), imóvel e que faz parte da microbiota normal do homem (parte da população) e que pertence à família Micrococcaceae. Ela produz toxinas denominadas de enterotoxinas, que quando ingeridas através do alimento contaminado com a pré- toxina formada provoca uma intoxicação alimentar estafilocócica ou a estafiloenterotoxemia cujos sintomas são náusea, vômito, câibra abdominal dolorosa, diarréia, sudorese, dor de cabeça, queda de pressão arterial entre outros. ⁽¹⁹⁾

A *Escherichia coli* é um bacilo gram- negativo móvel com flagelos peritríquios ou imóvel, anaeróbia facultativa que faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal do homem e outros animais de sangue quente, ela faz parte da família Enterobacteriaceae. Suas linhagens patogênicas são classificadas em cinco classes de acordo com os sintomas clínicos, virulência e patogenicidade: EPEC (E.coli enteropatogênica clássica), EIEC (E.coli enteroinvasora), ETEC (E.coli enterotoxigênica), EHEC (E.coli entero-hemorrágica) e EAggEC (E.coli enteroagregativa). Os sintomas de uma infecção alimentar causada por esse patógeno, variam como já foi dito, pois dependem da sua classificação e dentro desta do seu sorotipo, mas de modo geral ocorre sempre uma diarréia que pode ser branda, sanguinolenta ou muito grave com sangramento e eliminação de muco. A presença dessa bactéria é um indício de contaminação alimentar de origem fecal. ⁽²⁰⁾

O *Clostridium perfringens*, é um bacilo gram-positivo, anaeróbio formador de esporos, imóvel pertencente à família Bacillaceae, produz uma enterotoxina termossensível que esta associada à esporulação e também à intoxicação alimentar cujos sintomas são dores abdominais intensas, náuseas e diarréia aguda; os sintomas costumam aparecer de 8 a 12 horas após a ingestão do patógeno via alimento contaminado. O tipo C desse microorganismo causa uma enfermidade mais séria a enterite necrótica que é quase sempre fatal devido à infecção e necrose dos intestinos levando a uma septicemia. ⁽²¹⁾

Existe uma gama muito grande de microorganismos que podem causar uma DTA, acima foram descritos alguns dos mais encontrados e conhecidos, de forma simples e resumida.

3.3. Microbiota Simbiótica Normal

Todo ser humano, após seu nascimento começa a formar sua microbiota simbiótica normal, que será composta de bactérias e fungos, adquiridas através do contato com outras pessoas, leite materno e até mesmo do ambiente. Esses microorganismos vão estar presentes na pele, mucosas do nariz, boca, trato respiratório superior, trato gastrointestinal e trato geniturinário. A principal função exercida por essa microbiota é a de proteger e estimular uma resposta imune a outros antígenos, além de produzir vitaminas do complexo B e vitamina K. Alguns desses microorganismos são patógenos oportunistas podendo causar infecções caso haja danos teciduais ou quanto há um déficit imunitário do organismo. ⁽²²⁾

Fazem parte da microbiota humana bactérias como *Escherichia coli*, *Proteus sp*, *Enterobacter sp*, *Bacteoides sp*, *Fusobacterium sp*, *Bifidobacterium sp*, *Eubacterium sp*, *Lactobacillus sp*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus* e fungos como a *Candida albicans* e outros. Essa microbiota varia muito de indivíduo para indivíduo. ⁽²²⁾

3.4. Higiene: uma profilaxia eficiente

A higiene é tida como o conjunto de conhecimentos e técnicas para evitar doenças infecciosas usando desinfecção, esterilização e outros métodos de limpeza com o objetivo de conservar e fortificar a saúde. A higiene envolve também outros conceitos como o de assepsia e anti-sepsia.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), assepsia é o conjunto de medidas adotadas para impedir a introdução de agentes patogênicos no organismo e anti-sepsia é o uso de produtos sobre a pele e mucosas com o objetivo de reduzir a quantidade de microorganismos em sua superfície. ⁽²³⁾

Medidas simples de higiene como lavar corretamente as mãos, contribuem significativamente para evitar a propagação de patógenos, que poderiam vir a contaminar outros indivíduos, objetos, alimentos e outros.

A higiene no geral é uma profilaxia muito eficiente e pode evitar a disseminação de muitas doenças, além de proporcionar aos indivíduos mais saúde e bem estar. Existem fatores que estão estritamente ligados a higiene um deles é a educação, daí a importância de proporcioná-la a toda população.

4. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

A contaminação do alimento provém das mais variadas formas como, por exemplo, pelo mau armazenamento, conservação, manipulação entre outras. O indivíduo por sua vez tem como principal meio de se contaminar, ou melhor, de levar a contaminação ao alimento, a falta de higiene pessoal que envolve ações simples como lavar corretamente as mãos.

Deste modo, o trabalho busca fornecer à comunidade escolar, base para estudos relacionados à segurança alimentar. Sendo benéfico e de suma importância também para a sociedade da qual o público alvo faz parte, pois visa a conscientização dos futuros cidadãos do nosso município sobre uma problemática que ainda não recebe a devida atenção tanto por partes dos governantes quanto da sociedade civil.

Como Técnicos em Bioquímica, com formação multidisciplinar nas áreas Química e Biológica, pode-se aplicar os conhecimentos adquiridos no decorrer do curso, além de utilizar a nossa bagagem técnico - científica para realizar um trabalho que poderá gerar bons frutos profissionais principalmente na área da pesquisa. Enaltecendo também a nossa formação como indivíduos integrantes de uma sociedade que se encontra em constante mudança e adequação.

5. HIPÓTESE

Qual a maior fonte de contaminação: indivíduo ou alimento? Esta é uma questão complexa cuja resposta envolve diretamente: hábitos higiênicos pessoais e coletivos além de cuidados na preparação e manipulação dos alimentos. Portanto só é possível respondê-la analisando crítica e cientificamente o público alvo e o seu comportamento.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivos Gerais

Realizar análises microbiológicas das principais fontes de contaminação por microorganismos (mãos, alimentos), demonstrando e conscientizando sobre a importância da higiene não só no preparo dos alimentos, mas também na hora do consumo dos mesmos.

6.2. Objetivos específicos

- Analisar os alimentos servidos para o público alvo (crianças em idade pré- escolar) e verificar se há contaminação por microorganismos patogênicos nos mesmos;
- Analisar as mãos das crianças;
- Comparar os resultados das amostras alimentícias com os das amostras provenientes das mãos do público alvo a fim de criar um parâmetro sobre qual a maior fonte de contaminação: alimento ou indivíduo.
- Aplicar técnicas de análises microbiológicas: coloração de gram, obtenção de culturas puras, placas com meios seletivo-diferenciais e espalhamento.
- De modo didático, demonstrar a essas crianças a importância dos hábitos higiênicos desde a preparação do alimento até o consumo.

7. MATERIAIS

7.1.Reagentes

Reagente nome	Quantidade
Corantes para Gram	50 mL
PCA	500 gramas
NA	500 gramas
Mac Conkey	500 gramas
Peptona	500 amas

7.2.Vidrarias

Vidraria	Quantidade
Placa de Petri	24
Alça de Drigalsky	2
Erlenmeyer	5
Proveta	2
Tubinhos	15

7.3.Outros Materiais

Material	Quantidade
Cabo de Kolle	4
Bagueta de plástico	2
Autoclave	1
Balança analítica	1
Swab	33
Estante para tubos	3

8. CUSTOS

8.1.Reagentes

Reagente nome	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Corantes para Gram	50 mL	Indefinido	Indefinido
PCA	500 gramas	175,00	175,00
NA	500 gramas	122,45	122,45
Mac Conkey	500 gramas	147,00	147,00
Peptona	500 gramas	145,36	145,36

8.2. Vidrarias

Vidraria	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Placa de Petri descartável	24	0,8	19,20
Alça de Drigalsky	2	8,50	17,00
Erlenmeyer de 500 ml	5	26,50	132,50
Proveta de 250 ml	2	6,30	12,60
Tubos de ensaio pequeno	15	1,15	17,25
Lâmina	1 caixa	2,5	2,5
Becker 600 mL	1	9,9	9,9

8.3. Outros Materiais

Material	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Cabo de Kolle	4	9,20	36,80
Bagueta de plástico	2	1,72	3,44
Autoclave	1	1.079,00	1.079,00
Balança analítica	1	1731,60	1713,60
Swab	33	9,00 (pacote com 100)	9,00
Estante para tubos	3	18,00	54,00
Estufa de esterilização	1	691,45	691,45
Estufa Bacteriológica	1	2.131,00	2.131,00
Contador de colônias	1	1.647,25	1.647,25
Bico de Bunsen	1	25,93	25,93
Custo Total			8.192,23

Observação: Os preços podem variar, pois dependem do local onde a compra será realizada. A grande parte dos materiais utilizados foi fornecida pela escola.

9. MÉTODOS

O projeto visa a conscientização e orientação as crianças de idade pré- escolar sobre um assunto do qual elas desconheciam a importância; segurança alimentar, mostrando o quanto a higiene deve ser relevante principalmente no momento da alimentação.

Para isso foram coletadas amostras de vários pontos das mãos das crianças, utilizando SWAB's; as amostras coletadas foram colocadas na estufa bacteriológica para posterior aplicação das técnicas de microcultivo e microbiologia como: realizações de placas com meio seletivo-diferencial, além da coloração de gram, para identificação da morfologia dos microorganismos¹.

Foi elaborado um questionário (vide apêndice), que fora respondido a partir das observações feitas pelo grupo a cerca dos hábitos e condições de higiene dos manipuladores de alimento e do público alvo, nos dias das coletas de material.

9.1. Coleta de amostras biológicas com SWAB's

As amostras utilizadas serão coletadas com a ajuda de SWAB's (cotonetes de hastes longas esterilizadas), que são passados sobre o local desejado, ou seja, as mãos das crianças no momento da alimentação. Os SWAB'S serão imediatamente imersos em meio de cultura liquido, para evitar ao máximo a contaminação das amostras neste período de coleta e transporte. Essa coleta é considerada simples e não invasiva, pois não afeta a integridade física do público alvo.

9.2. Preparação de meios de cultura

Nos meios de cultura, sejam eles comuns ou não, tem-se uma proporção diferenciada que deve ser considerada na preparação dos mesmos. Essa proporção está indicada na embalagem do meio, na qual se relaciona a quantidade de água necessária para se hidratar determinada massa do produto, para que se obtenha a concentração esperada no final da preparação. De um meio para outro o que se difere no momento de preparar, além da proporção, é o local (placa ou tubos de ensaio) onde os meios serão armazenados para serem utilizados nas etapas subseqüentes.

No geral todos os meios seguem o mesmo padrão de preparação, as massas (os pós) são pesadas em uma balança de acordo com o volume de água recomendado, depois

¹ Para os métodos é importante reforçar que estes devem ser realizados em área estéril proporcionada pela chama direta do bico de *Bunsen*, para assim evitar contaminação da amostra por outros microorganismos.

são solubilizadas por uma pequena quantidade dessa água, acrescentando-se assim o restante da água, agora é preciso fundir esse meio, aquecendo-o, sem deixar que o mesmo entre em ebulição. Utiliza-se um béquer para a realização desta etapa.

Depois de resfriado parcialmente o meio deve ser transferido para um erlenmeyer, que será fechado por um tampão e logo após será envolvido por um papel alumínio para que o meio seja autoclavado, onde será esterilizado através de calor úmido por uns 15 minutos na temperatura adequada de 121°C.

9.3. Meios comuns: Nutrient Ágar (NA) e Plate Count Ágar (PCA)

Para esses meios considerados comuns tem-se o seguinte procedimento: após a retirada do meio da autoclave, transfere-se o mesmo do erlenmeyer para uma placa de Petri já esterilizada (em estufa de esterilização e secagem). Essa transferência e as demais etapas são realizadas na área estéril proporcionada pela chama direta do bico de Bunsen.

Tanto o NA quanto o PCA são meios simples e de fácil preparação e servem como meio de cultivo preliminar para análises das amostras que foram submetidas a testes microbiológicos como o isolamento de microorganismos para culturas puras e contagem padrão.

9.4. Meio seletivo-diferencial: *Mac Conkey*.

O meio de cultura *Mac Conkey* é utilizado no isolamento de bactérias Gram negativas, ele é classificado como seletivo, pois impede o crescimento de bactérias Gram positivas devido à presença do cristal violeta e de sais biliares, a classificação de diferencial é observada através da fermentação da lactose. A cor do meio após a incubação é o que permite a interpretação dos resultados obtidos, a mudança de cor esta relacionada com o pH do meio, se o caráter é ácido a cor esperada é rosa, as colônias rosa choque/vermelhas nessa situação as bactérias presentes são fermentadoras de lactose e se o caráter é alcalino a cor esperada é amarelo claro, as colônias brancas/sem cor indicam a presença de bactérias que não são fermentadoras de lactose.

9.5. Coloração: Diferencial de acordo com o método de Gram

A coloração de Gram serve para diferenciar os microorganismos (bactérias) de acordo com a estrutura física de sua parede celular. As que adotam coloração roxa são classificadas como Gram (+), e são coradas dessa forma graças a sua capacidade de reter

o complexo formado pelo cristal violeta mais iodo. Já as classificadas como Gram (-) são coradas de rosa, pois não conseguem reter esse complexo. Através dessa coloração também é possível observar a morfologia (cocos, bacilos, etc) das bactérias.

As bactérias gram-positivas possuem duas camadas: a membrana plasmática e uma camada espessa de peptidoglicano e é essa composição que permite a cor roxa, pois o precipitado que se forma pela ação do mordente (lugol) fica retido no interior da célula e, portanto essas células não serão descoloradas adotando assim a cor do corante primário (roxa).

As bactérias gram-negativas possuem três camadas: membrana plasmática, camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa e é essa composição que permite a cor rosa, pois o precipitado formado pelo mordente vai ser removido pelo agente descolorante (álcool-cetona), já que a membrana externa é parcialmente ou totalmente solúvel na presença do mesmo. As células descoloradas serão coradas pelo contra-corante (fucsina/safranina) adquirindo a cor rosa.

O procedimento da coloração é simples, mas exige atenção em alguns aspectos como não exagerar na quantidade de corante, não levar as bactérias a óbito no momento de fixar o material e executar os passos na ordem, para assim se obter bons resultados. No procedimento descrito abaixo, pode-se seguir o tempo pedido ou simplesmente realizar uma bateria direta.

Em uma lâmina limpa realiza-se o esfregaço da amostra a ser analisada, fixa-se o material levando a lâmina ao fogo, em seguida são colocados o cristal violeta (corante primário), a solução de iodo (mordente) para que o complexo esperado possa ser formado, uma mistura de álcool-acetona (descolorante) e safranina ou fucsina (contra-corante), entre a adição de um corante e outro escorreu-se o mesmo e lavou-se a lâmina com água corrente. Após a etapa de coloração espera-se que o material corado seque para sua posterior observação no microscópio com as objetivas de 40X e 100X(lembrando que para essa objetiva deve-se usar o óleo de imersão). Antes de visualizar a lâmina limpa-se a mesma (parte de trás) com algodão ou papel para retirada de corantes impregnados que poderiam vir a atrapalhar a visualização correta.

9.6. Obtenção de cultura pura: Esgotamento

A técnica do esgotamento é empregada para se diminuir a quantidade de microorganismos, obtendo assim colônias isoladas (puras), facilitando a identificação do microorganismo no geral, inclusive sua visualização no microscópio. Divide-se a placa de Petri em três partes, se pega o inóculo (pequena porção da amostra que contém os microorganismos) com a alça e realizam-se estrias por toda extensão de uma das partes da

placa, aquece-se a alça e depois de fria, inicia-se outro estriamento a partir do ponto que se tinha parado, repete-se esse passo para a parte faltante da placa e leva-se a mesma para a estufa bacteriológica.

9.7. Técnicas de contagem: Diluição seriada e espalhamento em placa

Diluição seriada: é um importante método, pois diminui a concentração de bactérias, ele é muito útil quando se deseja saber quantas unidades formadoras de colônias (UFC) existem em uma suspensão bacteriana. A metodologia é baseada na diluição progressiva de uma alíquota de amostra concentrada, ou seja, realizam-se uma série de diluições de uma amostra concentrada, em que uma parte da mesma é transferida para uma solução esterilizada de volume conhecido (geralmente a solução utilizada é a água destilada).

O espalhamento em placa (Spread Plate): é um método de contagem que tem origem a partir da diluição seriada. Consiste em se pegar um pequeno volume (0,1 ml) da solução bacteriana (extrato) obtida e espalhá-la em uma placa de Petri contendo meio de cultura (NA ou PCA) já esterilizado e solidificado, utilizando uma alça de *Drygalski*, com posterior incubação (de 24 horas). Dessa forma é possível quantificar as colônias já que as mesmas crescerão separadamente. Depois de contar as colônias em um contador é necessário multiplicar o número encontrado pela diluição, assim se obtém quantas UFC's existem na amostra concentrada.

9.8. Fluxograma das Análises

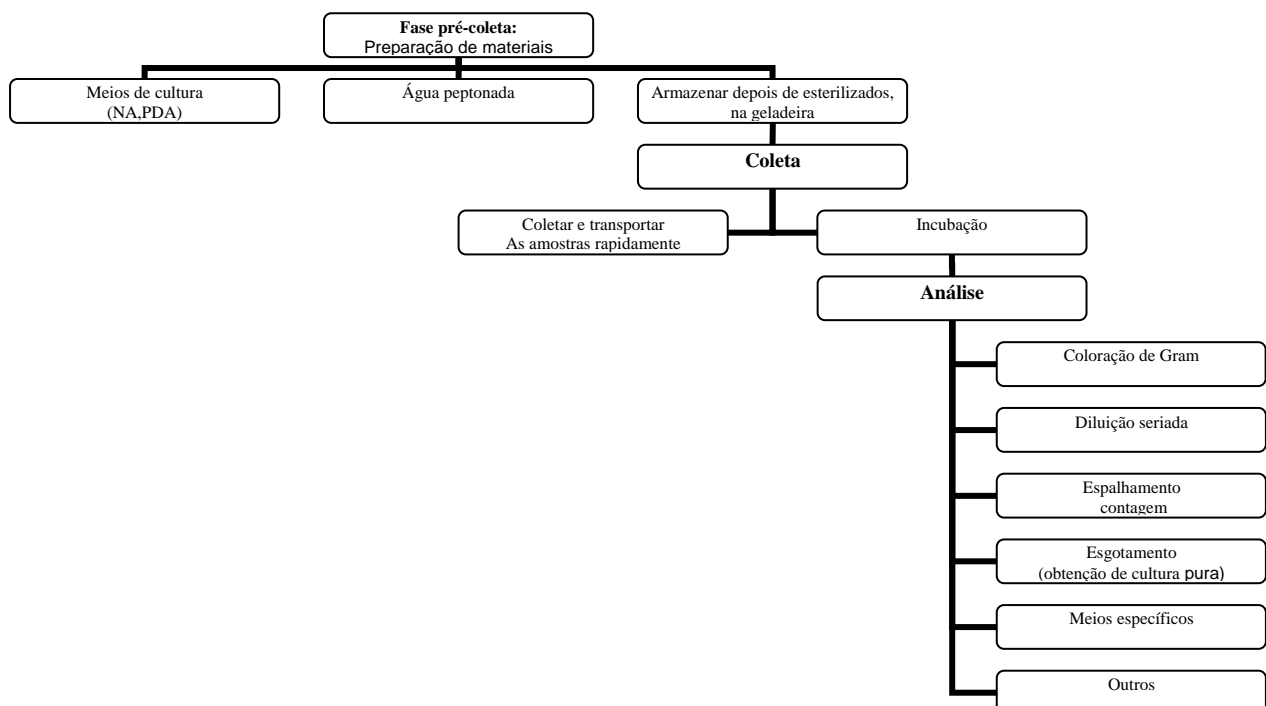


Figura 1. Fluxograma das Análises.

9.9. Conscientização na Creche

Após os resultados das análises, o grupo vai realizar uma palestra na creche para conscientização. O foco será higiene, dicas de como lavar as mãos e os alimentos e algumas doenças relacionadas a isso.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1. ANÁLISES

Foram realizadas ao longo do projeto três coletas com posterior análise das mesmas, sendo a terceira coleta a de maior confiabilidade, por isso são os resultados a partir dela obtidos que estarão descritos a seguir e nos apêndices se encontram os resultados da primeira e segunda coleta.

Com as amostras da terceira coleta, foram realizadas todas as técnicas microbiológicas as quais o grupo se propôs a realizar: coloração de Gram, esgotamento, diluição seriada, espalhamento e uso de meio seletivo-diferencial (Mac Conkey).

As figuras 2-5 ilustram os processos de coletas, visualização de lâminas e técnicas do procedimento.



Figura 1. Coleta com SWAB's.

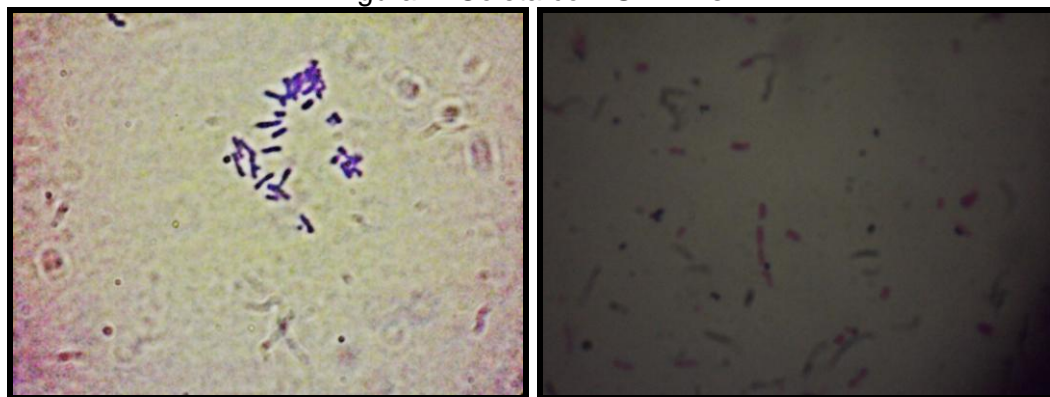


Figura 2. Bacilos gram + (microscópio óptico aumento de 1000x) coloração de Gram e Bacilos gram –(microscópio óptico aumento de 1000x) coloração de Gram.

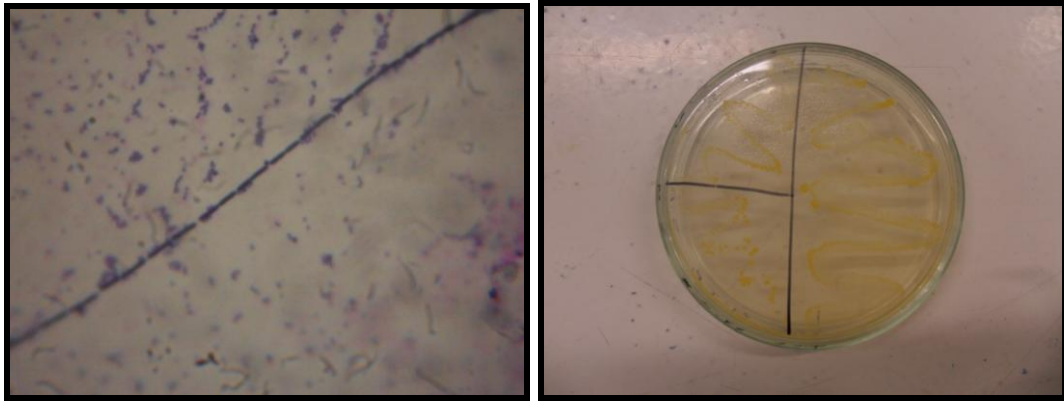


Figura 4. Estreptobacilo gram positivas(microscópio óptico aumento de 1000x) coloração de Gram e colônia amarela, obtida através da técnica de esgotamento.

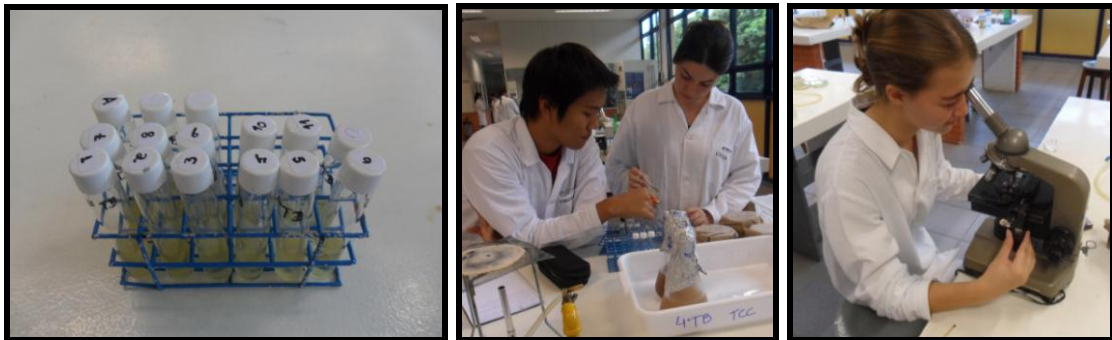


Figura 5. Tubos contendo meio de cultura e o material coletado, alunos verificando crescimento microbiano e visualização da lâmina com coloração de gram.

Os resultados obtidos estão descritos no gráfico 1 e 2 e correspondem respectivamente ao crescimento encontrado nas amostras do indivíduo e do alimento, quanto a contagem os resultados estão descritos no gráfico 3, que demonstra quantas unidades formadoras de colônia (UFC's), existiam nas amostras inoculadas tanto das mãos quanto do alimento por mililitro, os valores de UFC's já encontram-se multiplicados pela diluição utilizada.

As amostras de 1 a 10 correspondem às mãos das crianças; as amostras 6 e 7 não constam no gráfico, pois as colônias eram muitas, sendo portanto incontáveis. As amostras referentes às mãos das crianças 3 e 9, apresentaram maior quantidade de UFC's, ambas as crianças não lavaram as mãos corretamente e antes da coleta tocaram em vários lugares levando as mãos na boca e a outras mucosas.

No meio Mac Conkey, as amostras 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10 e alimento apresentaram crescimento, nas demais não houve crescimento bacteriano. Embora tenha ocorrido crescimento, não foi possível afirmar que as bactérias gram negativas encontradas nas análises eram ou não fermentadoras de lactose, pois houve o crescimento não só de

bactérias gram negativas, mas também de gram positivas (o que não deveria ter acontecido), umas das possíveis causas para a não seleção e diferenciação dos microorganismos está relacionada com a qualidade do meio de cultura.

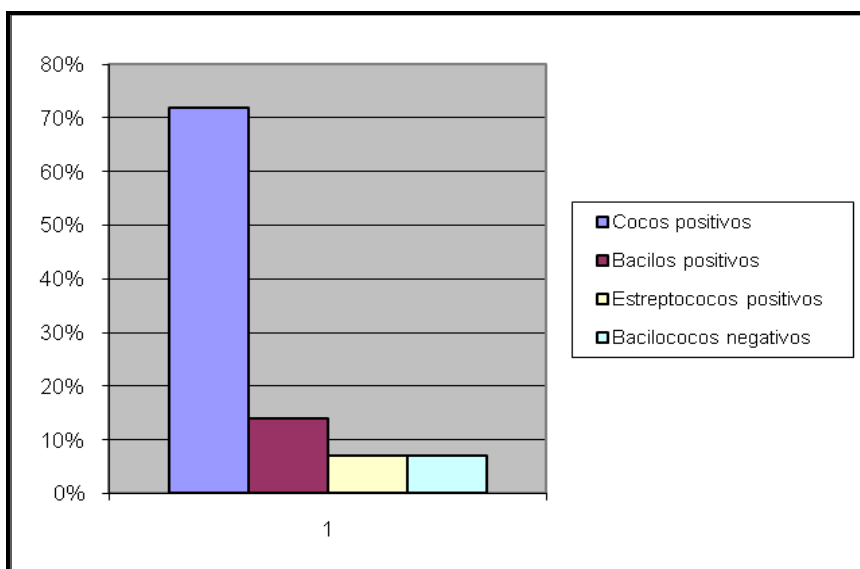


Gráfico 1. Crescimento nas amostras das mãos.

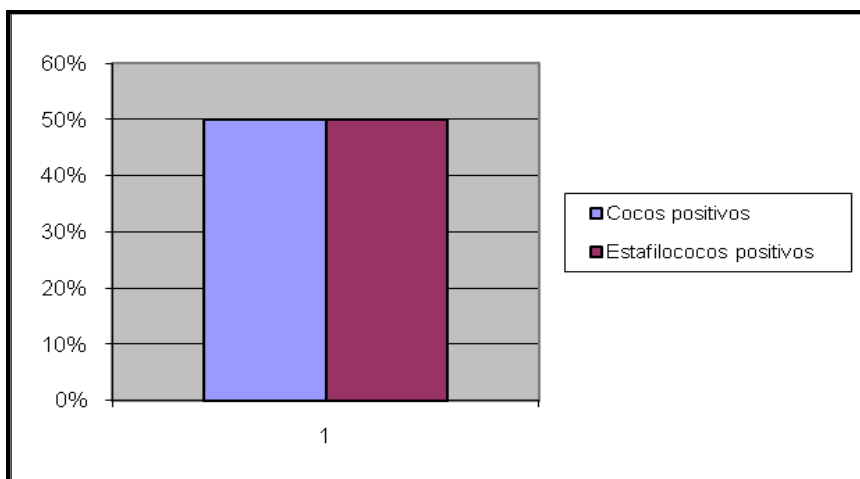


Gráfico 2. Crescimento nas amostras do alimento.

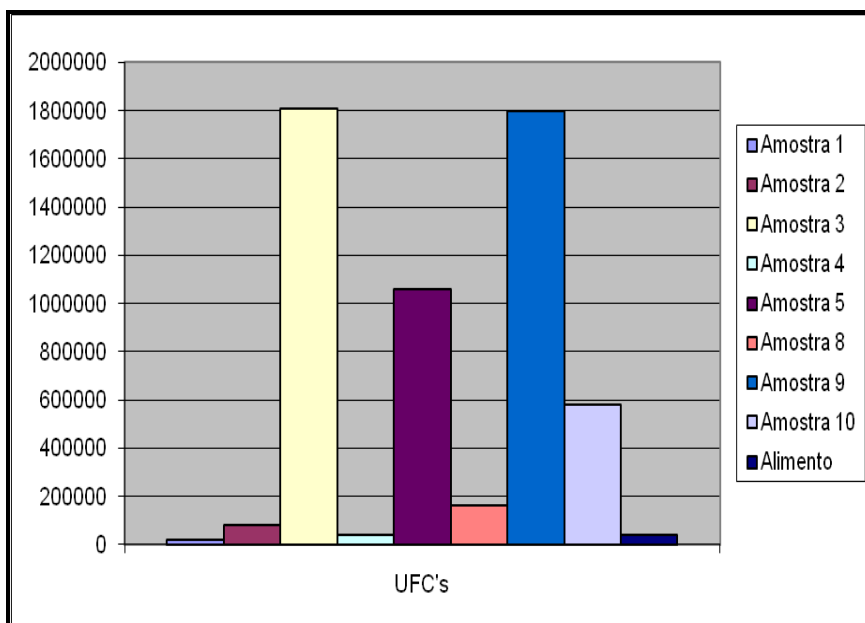


Gráfico 3. Contagem em unidades formadoras de colônia dos microorganismos das amostras (crianças de 1 a 10 e alimento).

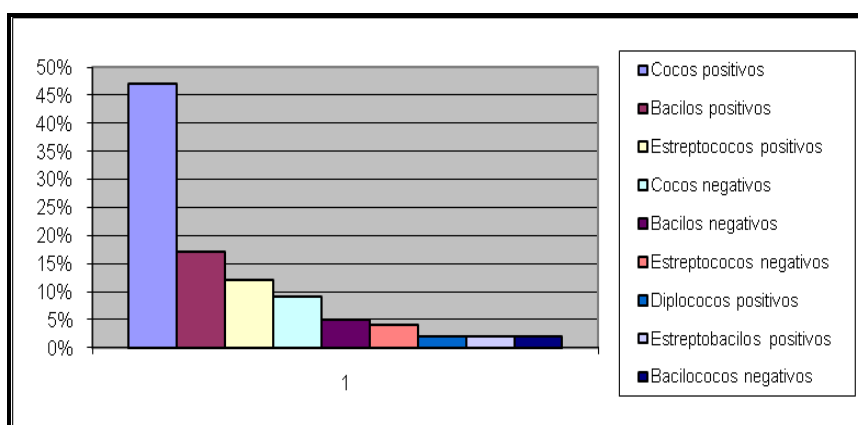


Gráfico 4: Contaminação geral (todas as coletas) do indivíduo.

De modo geral (analisando conjuntamente os resultados das três análises incluindo a primeira e a segunda) a maior parte dos microorganismos (mais que a metade) encontrados pertence à flora bacteriana normal da pele, no entanto algumas das bactérias encontradas podem fazer parte da flora intestinal ou de outros locais que não a pele, podendo vir a causar alguma das muitas DTA's existentes.

No alimento encontrou-se uma diversidade bem menor de bactérias quanto à morfologia do que nas amostras do indivíduo (crianças), o que de certa forma ilustra o potencial do indivíduo em ser uma fonte de contaminação relevante, conforme o gráfico 4 e 5.

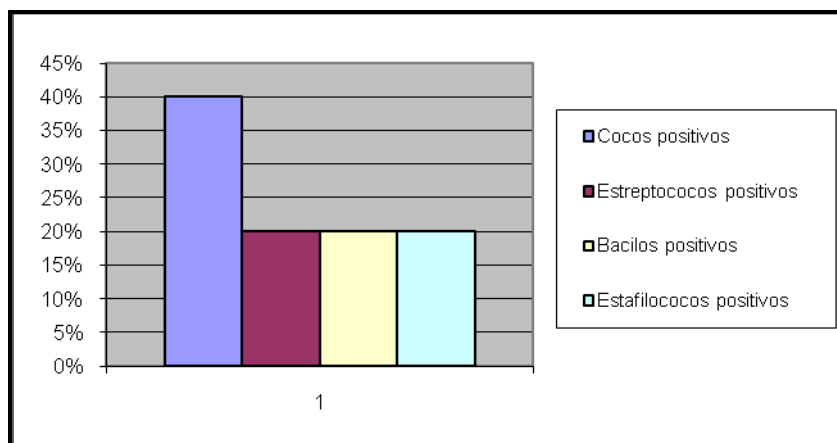


Gráfico 5. Contaminação geral (todas as coletas) do alimento.

O grupo observou o comportamento das crianças e dos funcionários na preparação do alimento e percebeu que, principalmente na hora da alimentação, as crianças não lavam as mãos ou não lavam corretamente. As condições de higiene na cozinha são adequadas. (ver questionário no apêndice).

10.2. Conscientização

Após os resultados obtidos nas análises, o indivíduo se mostrou a maior fonte de contaminação. Sendo assim, o grupo realizou na creche uma palestra sobre a importância da higiene, principalmente das mãos e na hora da alimentação (figura 6).

Foi uma atividade bem dinâmica, com imagens adequadas ao público-alvo. O grupo ensinou as crianças a lavar as mãos corretamente e também orientou os funcionários.



Figura 6. Palestra na creche para conscientização das crianças.

11. CONCLUSÃO

Através das análises, o indivíduo demonstrou ser uma importante fonte de contaminação, podendo ser ele o causador das doenças transmitidas pelo alimento devido à contaminação do mesmo no momento da refeição.

Essa contaminação se deve a sua má higiene ou a falta da mesma, que envolve medidas simples como lavar as mãos corretamente.

As condições nas quais os alimentos são transportados, armazenados e preparados devem ser observadas com atenção, para que não ocorra contaminação do mesmo nessas etapas que precedem o consumo.

Na creche em questão pode-se dizer que há uma segurança alimentar, que se encontra ameaçada por hábitos e fatores que podem levar a uma insegurança alimentar do ponto de vista qualitativo, tendo a higiene pessoal como o principal fator.

A higiene demonstrou ser um fator primordial, mas mais do que a higiene a educação e conscientização da população a cerca desses assuntos é que precisa ser trabalhada para se alcançar uma verdadeira segurança alimentar.

12. PERSPECTIVAS

Espera-se que a partir do presente trabalho, outros possam ser realizados levando em conta os mesmos ou outros fatores relacionados à segurança alimentar.

Que por meio das análises microbiológicas consiga se identificar os microorganismos (pelo menos gênero), o que já não foi possível com este trabalho, para que os resultados possam ser seguramente comparados aos de literaturas sobre o assunto. Fazendo com que esse tema de extrema importância entre em pauta em nossa sociedade, seja discutido, buscando formas de alcançar a segurança alimentar.

13. BIBLIOGRAFIA

BELIK, W. Perspectivas para segurança alimentar e nutricional no Brasil. Saúde e Sociedade, v.12, n.1, p.12-20, jan-jun. 2003.

MENDES, R.P et al. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. Rev. Nutr., Campinas, v.17, n.2, abr-jun. 2004.

SANTOS, L.M.P et al. Avaliação de políticas públicas de segurança alimentar e combate à fome no período 1995-2002. 4 – Programa Nacional de Alimentação Escolar. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.23, n.11, p.2681-2693, nov. 2007.

MARINHO et al. Percepções e práticas dos diretores e coordenadores acerca da alimentação infantil em creches públicas do município de Jandira, São Paulo, Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, 17(2): 40-49, 2010.

Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional

<http://www4.planalto.gov.br/consea>

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GIL, Antonio Carlos. *Como elaborar projetos de pesquisa*. 5. ed. São Paulo: Atlas, 2008.

2. Tema: Casos de intoxicação alimentar (DTA'S)

<http://sna.saude.gov.br/noticias.cfm?id=4348> (Acessado em: 01/10/10).

3. Tema: Dados sobre surtos de intoxicação alimentar

<http://gentesemsaude.blogspot.com/2008/09/estudo-revela-que-mais-de-110-mil.html> (Acessado em: 01/10/10).

4. Tema: Contaminação Biológica de alimentos

<http://www.abanorte.com.br/noticias/noticias-principal/contaminacao-biologica-o-risco-invisivel-na-era-do-alimento-seguro/> (Acessado em: 01/10/10).

5. Tema: Intoxicação Alimentar

http://www.divirtase.uai.com.br/html/sessao_45/2010/01/26/ficha_saudeplena_saude/id_sessao=45&id_noticia=20119/ficha_saudeplena_saude.shtml (Acessado em: 01/10/10).

6. Tema: Conseqüências da intoxicação alimentar

<http://qualfood.biostrument.com/?option=noticia&task=show&id=11324> (Acessado em: 01/10/10).

7. Tema: Segurança Alimentar

<http://www.fao.org/DOCREP/003/W3613P/W3613P00.HTM>

8. Tema: Infecções e o seu combate

http://www.phadia.com.br/upload/Brazil/Not%C3%ADcias/Files/recap28_v3.pdf (Acessado em: 28/10/10).

9. LEITE, L.H.M. Boas práticas de higiene e conservação de alimentos em cozinhas residenciais de usuários do programa saúde da família-Lapa. *Rev. Ciênc. Méd.*, Campinas, 18(2): 81-88, mar.-abr., 2009.

10. Tema: Microorganismos causadores de DTA'S

http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/microorganismos/patogenico.html (Acessado em: 01/10/11). PELCZAR, M; REID, R e CHAN, E.C.S. Microbiologia.

Infecções humanas transmitidas pelos alimentos e pela água. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981, 2 v. 689-720 p.

12.Tema: Meios de cultura para bactérias

<http://prokariotae.tripod.com/meiosdecultura.htm> (Acessado em: 21/10/10).

13. Tema: Coloração método de Gram

<http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm> (Acessado em: 21/10/10).

14.Tema: Microorganismos contaminantes de alimento

<http://www.pediatriasaopaulo.usp.br/upload/pdf/541.pdf> (Acessado em: 28/10/10).

15.Tema: Microrganismos e os sintomas causados por eles

http://www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm (Acessado em: 28/10/10).

16.Tema: Profilaxia da intoxicação alimentar

<http://www.scribd.com/doc/2384879/Intoxicacao-Alimentar> (Acessado em: 28/10/10).

17.Tema: Métodos rápidos e modernos de microbiologia

<http://www.fooddesign.com.br/arquivos/academia/nelianesilveira.pdf>
(Acessado em:09/03/11).

18.FORSYTHE, S.J. Microbiologia da segurança alimentar. Artmed, 2002.

19.Tema: Intoxicação Alimentar Estafilocócica

<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Staphylo.htm> (Acessado em: 18/08/11).

20.Tema: Infecção Alimentar por *Escherichia coli*

http://www.unicamp.br/fea/lsvm/cursos/ta918_1.html (Acessado em: 19/08/11).

21.Tema: Patógeno de origem alimentar *C.perfringens*

<http://www.segurancalimentar.com/conteudos.php?id=243> (Acessado em: 19/08/11).

22. TORTORA, G.J; FUNKE, B.R e CASE, C.L. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2005.

23.Tema: Assepsia e anti-sepsia

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/organiza/inaiss/glossario.doc>

24. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e Documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.

25. SEVERINO, Antônio Joaquim. *Metodologia do trabalho científico*. 20 ed. rev. e ampl. São Paulo: Cortez, 2006.

26. OLIVEIRA, Nirlei e ESPINDOLA, Carlos R. *Trabalhos acadêmicos: recomendações práticas*. São Paulo: CEETPS, 2003.

15. APÊNDICES

15.1. Cronograma

Ano	2011									
Atividades	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Planejamento	X	X	X							
Visita Técnica à creche (Reconhecimento do local)		X								
Visita Técnica à creche (observação e coletas)			X	X	X					
Análises microbiológicas					X					
Diluição seriada					X	X				
Análises microbiológicas II (esgotamento, espalhamento e Mac Conkey)					X	X				
Tabulação de Resultados						X	X			
Palestra Creche							X			
Finalização parte escrita TCC							X			
Mostra de Projetos FETEPS								X		

15.2. Questionário de Observação

1. Hábitos das funcionarias:

Uso de EPI (touca, avental)

(X) Sim () Não

Higiene pessoal

(X) Boa () Regular () Ruim

Falam no ato da preparação?

() Sim (X) Não

Lavam a mão constantemente?

(X) Sim () Não

2. Hábitos das Crianças:

Após brincarem lavam a mão?

() Sim (X) Não

Colocam o dedo no nariz?
 Sim Não

Coçam-se constantemente?
 Sim Não

Suas vestes estão limpas?
 Sim Não

Crianças de diferentes faixas etárias se alimentam no mesmo horário?
 Sim Não

Há muita conversa na hora da refeição?
 Sim Não

Lavam a mão corretamente?
 Sim Não Não lavaram

3. Objetos do refeitório e cozinha

Panelas estão aparentemente limpas?
 Sim Não

Os utensílios são de que material?
Vidro (pratos), alumínio (talheres) e plástico (copos).

Mesa onde as crianças se alimentam, sofrem algum tipo de higienização especial?
 Sim Não

Observação: Algumas crianças foram ao banheiro e não lavaram a mão.

15.3. Resultados das análises parciais (1° e 2° coleta):

Com as amostras da primeira coleta, foram realizadas as seguintes técnicas microbiológicas: coloração de Gram e esgotamento. As técnicas de diluição seriada e espalhamento não foram realizadas, pois poderiam ter seus resultados alterados devido a idade avançada da colônia. Um incidente com a geladeira onde as placas de esgotamento haviam sido armazenadas inviabilizou a visualização dos resultados dessa técnica.

As amostras das mãos apresentaram o crescimento das bactérias segundo o gráfico 6, enquanto que o alimento teve o crescimento das bactérias descritos no gráfico 7. A diversidade em termos de morfologia de microorganismo foi bem maior nas mãos das crianças do que no alimento como se pode observar pela análise dos gráficos.

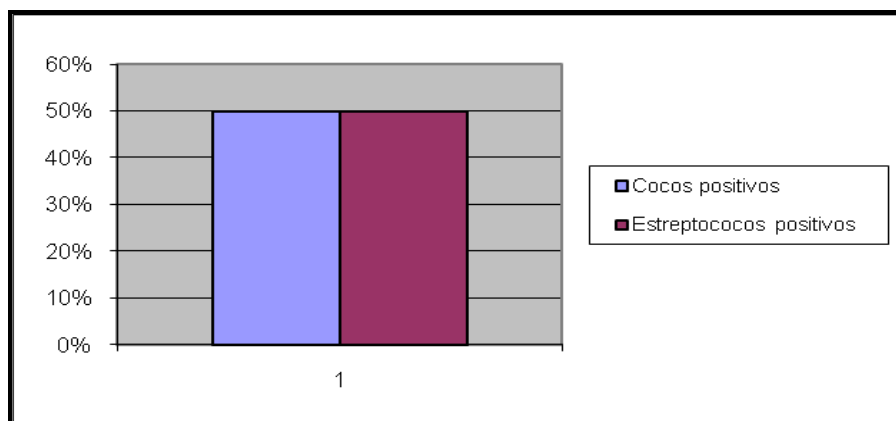


Gráfico 7. Amostra do alimento coleta 1.

Com as amostras da segunda coleta, foram realizadas as técnicas de coloração de Gram e esgotamento. As técnicas de diluição seriada e espalhamento também não foram realizados, pois o grupo ficou sem acesso ao laboratório devido a um feriado.

O crescimento observado nos indivíduos esta relacionado no gráfico 8 e do alimento no gráfico 9, também observou-se nessa análise que os indivíduos apresentaram um gama muito maior de microorganismos que o alimento.

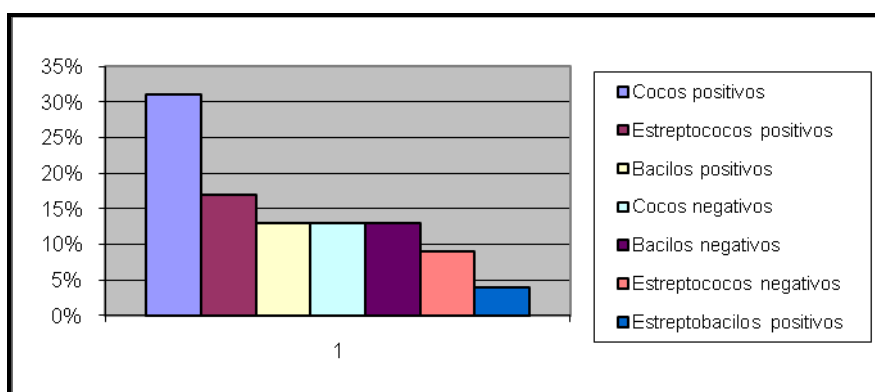


Gráfico 8. Amostras das mãos coleta 2.

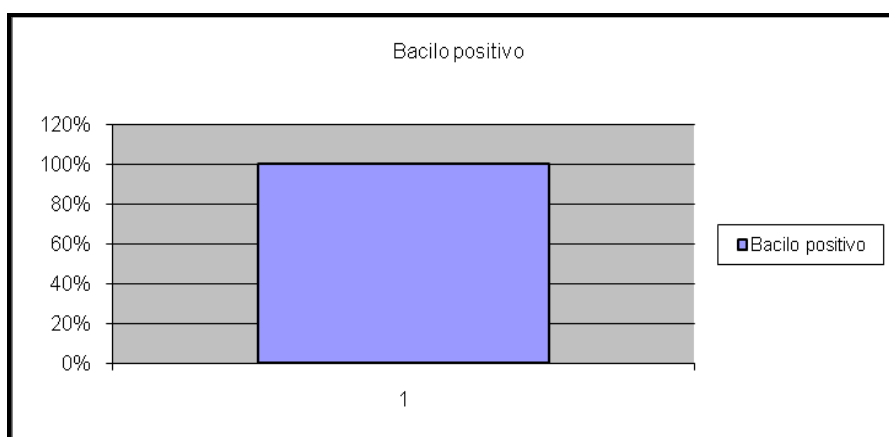


Gráfico 9. Amostra do alimento coleta 2.