

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO  
Área: Inspeção de Produtos de Origem Animal**

Aluno: Mallu Jagnow Sereno GRR: 20093902  
Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Vanerli Beloti e Prof. Dr. Germano Francisco Biondi  
Supervisor: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte das exigências para conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

**PALOTINA – PR  
Dezembro de 2013**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná  
Setor Palotina  
Curso de Medicina Veterinária

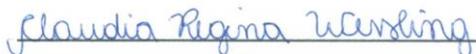
Relatório Final de Estágio Supervisionado  
Área de Estágio: Inspeção de Produtos de Origem Animal  
Acadêmica: Mallu Jagnow Sereno  
Orientador de Estágio UEL: Prof. Dr<sup>a</sup>. Vanerli Beloti  
Orientador de Estágio UNESP: Prof. Dr. Germano Francisco Biondi  
Supervisor de Estágio: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

O PRESENTE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO FOI  
APRESENTADO E APROVADO PELA SEGUINTE BANCA  
EXAMINADORA:

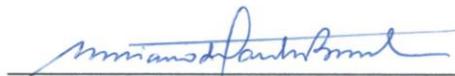


---

Prof<sup>a</sup> Cibeli Viana



Claudia Regina Wessling



---

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot  
Supervisor

Palotina, 16 de dezembro de 2013

"Que a felicidade não dependa do tempo, nem da paisagem, nem da sorte, nem do dinheiro. Que ela possa vir com toda a simplicidade, de dentro para fora, de cada um para todos. Que as pessoas saibam falar, calar e acima de tudo ouvir. Que tenham amor ou então sintam a falta de não tê-lo. Que tenham ideais e medo de perdê-lo.

Que amem ao próximo e respeitem sua dor. Para que tenhamos certeza de que:

Ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade."

Carlos Drummond de Andrade

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus pela tranquilização durante meus desabafos, renovando a cada dia minhas forças e disposição para continuar firme e seguindo em frente até a reta final.

Aos meus pais Orlei e Tânia pelo amor, carinho, educação e orientação que com certeza foram indispensáveis nas decisões e escolhas tomadas até o momento, além do apoio e da segurança que sempre me transmitiram para eu vencer as dificuldades dessa vida.

À minha irmã Vanessa que sempre tomei como exemplo de caráter e também de sabedoria. E a toda minha família, em especial meus tios Jonas e Devanir e minhas tias Sonia e Neusa, que sempre acreditaram em mim e, sobretudo, me incentivaram e apoiaram nessa jornada.

Ao meu namorado Daniel presente em momentos alegres e até em momentos que não eram nada fáceis, porém sempre unidos, mantínhamos o companheirismo para continuarmos a caminhada.

Às amigas Isabelle, Karol, Kássia e Shaiely, que mesmo cada uma correndo atrás dos próprios objetivos sempre estavam de alguma forma me apoiando. E à Jéssica, Juliana, Maria e Patrícia, minha "Família Palotina", que compartilharam as experiências vividas nestes últimos 5 anos, sendo as vezes "mães", irmãs, parceiras e "psicólogas", incluindo tudo que tem direito nessas relações, desde brigas,

discussões, fofocas e muita sinceridade e amizade. A todas vocês, muito obrigada por deixar eu fazer parte de suas vidas e por terem contribuído para meu crescimento enquanto pessoa!

Aos colegas da XVII turma de Medicina Veterinária, UFPR - Setor Palotina, pelas trocas de conhecimentos e discussões, amizade, companheirismo, troca de ideias e diversão nas mais "badaladas" festas de Palotina.

De forma geral um agradecimento especial aos que foram ou que são integrantes do LACOMA, principalmente a Cibeli, Juliano, Rosana e Vanessa pelo apoio durante a execução dos projetos, conhecimentos compartilhados e horas de descontração.

Agradeço também ao Professor Luciano Bersot que me orientou desde o segundo período da faculdade, contribuindo de forma importante para meu futuro profissional, desde a graduação com estágios, iniciação científica até a realização do estágio curricular supervisionado, proporcionando muitas oportunidades que influenciaram na minha decisão sobre qual área seguir após a graduação.

À UEL e à UNESP que abriram suas portas para realização deste estágio. E a todos os funcionários, residentes, pós graduandos e professores, que se demonstraram atenciosos e prestativos, auxiliando e repassando todo conhecimento e experiência prática.

## RESUMO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso refere-se as atividades técnicas desenvolvidas do período de 05 de agosto a 06 de setembro de 2013 na Universidade Estadual de Londrina – UEL, e do período de 09 de setembro a 19 de novembro de 2013 na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Botucatu, como atividades da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. As atividades foram desenvolvidas na área de Inspeção e Microbiologia de Produto de Origem Animal sob a orientação da Prof. Dra. Vanerli Beloti na UEL e do Prof. Dr. Germano Francisco Biondi na UNESP, sob a supervisão local da Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot. Foram contemplados neste Trabalho de Conclusão de Curso os elementos descritivos constantes do Plano de Atividades do Estágio. Foi caracterizada a estrutura e o funcionamento do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal - LIPOA da UEL e do Serviço de Orientação à Alimentação Pública - SOAP da FMVZ-UNESP, em especial em relação às análises microbiológicas e físico-químicas realizadas na rotina de cada laboratório de diferentes produtos objetivando verificar se os mesmos atendiam os parâmetros de qualidade e identidade, e microbiológicos.

Palavras-chave: Inspeção; Análises microbiológicas; Análises físico-químicas.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Sala de permanência .....	19
FIGURA 2. Sala de recepção .....	19
FIGURA 3. Sala de preparo de material.....	20
FIGURA 4. Autoclave de material limpo.....	20
FIGURA 5. Sala de distribuição de meios .....	20
FIGURA 6. (a) Sala de lavagem de material. (b) Autoclave e geladeira para material contaminado.....	21
FIGURA 7. Sala de análises físico-químicas.....	21
FIGURA 8. Sala de paramentação.....	22
FIGURA 9. Capela .....	22
FIGURA 10. Sala de incubação .....	23
FIGURA 11. Sala de repique.....	23
FIGURA 12. Armazenamento de amostras e culturas isoladas .....	24
FIGURA 13. Almoxarifado .....	24
FIGURA 14. Placa de micro-organismos mesófilos em PCA. ....	29
FIGURA 15. Placa de Petrifilm™ AC.....	29
FIGURA 16. (a) Resultado positiva na prova presuntiva. (b) Resultado positivo na prova confirmativa para coliformes a 35°C e 45°C.....	30
FIGURA 17. (a) Placa de micro-organismo do gênero Salmonella em BPLS (b) Placa de micro-organismo do gênero Salmonella em XLD .....	35
FIGURA 18. Tubos com a presença da enzima peroxidase .....	41
FIGURA 19. Tubo com teste positivo e negativo para presença de fosfatase .....	42
FIGURA 20. Tubo negativo e positivo para presença de amido.....	43
FIGURA 21. Amostra negativa e positiva para presença de sacarose.....	44
FIGURA 22. Tubo positivo e negativo para presença de cloreto de sódio acima da faixa de normalidade .....	45
FIGURA 23. Kitasato acoplado na pipeta de Pasteur .....	46
FIGURA 24. Resultado negativo e positivo para presença de álcool etílico.....	46
FIGURA 25. Resultado positivo e negativo na análise de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	48
FIGURA 26. Resultado positivo e negativo na prova de detecção de formaldeído ...	49
FIGURA 27. Resultado positivo e negativo para pesquisa de hipoclorito .....	50
FIGURA 28. Resultado positivo e negativo para prova de neutralizantes de acidez.	51

FIGURA 29. Secretaria e sala de reuniões. ....	53
FIGURA 30. (a) Sala dos residentes. (b) Sala dos pós-graduandos .....	54
FIGURA 31. Laboratório da pesquisa .....	54
FIGURA 32. Sala de preparo de meios, lavagem de material e autoclavação.....	55
FIGURA 33. (a) Laboratório de microbiologia (b) Estufas com várias temperaturas para incubação das análises microbiológicas .....	56
FIGURA 34. Laboratório de análises físico-químicas.....	56
FIGURA 35. Sala de descarte de materiais contaminados .....	57
FIGURA 36. Almoxarifado .....	57
FIGURA 37. (a) Higienização e flambagem da torneira. (b) Recipiente contendo a água para análise.....	59
FIGURA 38. Prova da coagulase positiva .....	64
FIGURA 39. Aferição do pH da carne através do pHmetro.....	69
FIGURA 40. Resultado positivo e negativo para prova H <sub>2</sub> S.....	70
FIGURA 41. Realização da prova de Éber.....	71
FIGURA 42. Análise de acidez do leite materno .....	73
FIGURA 43. Análise do crematócrito do leite materno. (a) O capilar era fechado em uma das pontas utilizando o fogo. (b) Centrífuga utilizada na prova.....	74
FIGURA 44. Reação de Fiehe. (a) Alta concentração de HMF. (b) Resultado esperado na reação .....	77
FIGURA 45. Refratômetro de Abbé.....	79
FIGURA 46. Prova da dureza da água, sendo o erlenmeyer "A" depois da titulação e o erlenmeyer "B" antes da tilulação.....	82

## LISTA DE TABELA

TABELA 1: Provas bioquímicas e resultados esperados para caracterização de <i>Salmonella</i> sp.....	37
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Aeróbios Mesófilos
APT	Água Peptonada Tamponada
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Caldo Brain Heart Infusion
BP	Ágar Baird-Parker
BPLS	Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
BS	Ágar Bismuto Sulfito
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de Cálcio
CRL	Cloro Residual Livre
DHVSP	Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
H <sub>2</sub> S	Ácido Sulfídrico
H <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HEB	Hospital Estadual de Bauru
HMF	Hidroximetilfurfural
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
IC	Índice Crioscópico
IN	Instrução Normativa
LIA	Ágar Lisina Ferro

LIPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
LST	Lauril Sulfato de Sódio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MO	Matéria Orgânica
MRVP	Methyl Red and Voges Proskauer
NA	Nitrogênio Amoniacal
NH <sub>3</sub>	Gás Amônio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de Amônio
NMP	Número Mais Provável
PCA	Ágar Padrão para Contagem
pH	Potencial Hidrogeniônico
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RV	Rappaport Vassiliadis
SC	Selenito Cistina
SFP	Ágar Shahidi-Ferguson Perfringens
SOAP	Serviço de Orientação à Alimentação Pública
STND	Serviço Técnico de Nutrição e Dietética
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
TT	Caldo Tetrionato
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade Formadora de Colônias

UNESP	Universidade Estadual Paulista
UTRA	Unidade Técnica Regional de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
VBBL	Caldo Verde Brilhante Bile Lactose
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO</b> .....	18
2.1 ÁREA FÍSICA .....	19
2.1.1 Sala de permanência .....	19
2.1.2 Sala de recepção de amostras .....	19
2.1.3 Sala de preparo de material .....	20
2.1.4 Sala de descarte e lavagem de material contaminado .....	20
2.1.5 Sala de análises físico-químicas .....	21
2.1.6 Sala de Paramentação .....	21
2.1.7 Capela .....	22
2.1.8 Sala de Incubação .....	22
2.1.9 Sala de repique .....	23
2.1.10 Sala de armazenamento de amostra .....	23
2.1.11 Almoxarifado .....	24
<b>3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</b> .....	25
3.1 RECEPÇÃO E CADASTRO DE AMOSTRAS .....	25
3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS .....	25
3.2.1 Preparo da amostra .....	25
3.2.1.1 Leite e derivados líquidos .....	25
3.2.1.2 Produtos lácteos sólidos .....	26
3.2.2 Procedimentos para diluição de amostras .....	26
3.2.2.1 Leite e derivados líquidos .....	26
3.2.2.2 Produtos lácteos sólidos .....	27
3.2.3 Análise de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM) .....	27
3.2.3.1 Método de análise .....	27

3.2.4	Determinação do NMP de coliformes a 35°C e a 45°C .....	29
3.2.4.1	Método de análise .....	30
3.2.5	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. ....	31
3.2.5.1	Método de análise .....	34
3.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS.....	37
3.3.1	Determinação do ponto de congelamento (índice crioscópico ou crioscopia) .....	37
3.3.1.1	Método de análise .....	38
3.3.2	Pesquisa de peroxidase .....	39
3.3.2.1	Método de análise .....	40
3.3.3	Pesquisa de fosfatase alcalina .....	41
3.3.3.1	Método de análise .....	41
3.4	PROVAS PARA DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE .....	42
3.4.1	Adição de reconstituintes .....	42
3.4.1.1	Pesquisa de amido.....	43
3.4.1.2	Pesquisa de sacarose .....	44
3.4.1.3	Pesquisa de cloreto de sódio .....	44
3.4.1.4	Pesquisa de álcool etílico .....	45
3.4.2	Adição de conservantes .....	46
3.4.2.1	Pesquisa de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	47
3.4.2.2	Pesquisa de formaldeído.....	48
3.4.2.3	Pesquisa de cloro e hipoclorito.....	49
3.4.3	Adição de neutralizantes de acidez.....	50
3.4.3.1	Pesquisa de bicarbonato de sódio .....	51
<b>4.</b>	<b>DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO .....</b>	<b>52</b>
4.1	ÁREA FÍSICA.....	53
4.1.1	Sala de reuniões e secretaria.....	53
4.1.2	Salas de apoio aos profissionais .....	54

4.1.3	Laboratório da pesquisa .....	54
4.1.4	Salas de preparo de meios, lavagem de material e autoclavação .....	55
4.1.5	Laboratório de microbiologia .....	55
4.1.6	Laboratório de análises físico-químicas .....	56
4.1.7	Sala de descarte de materiais contaminados.....	56
4.1.8	Almoxarifado .....	57
4.1.9	Sala da Unidade Técnica Regional de Agricultura, Pecuária e Abastecimento .....	57
<b>5.</b>	<b>ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....</b>	<b>58</b>
5.1	RECEPÇÃO, COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS E CADASTRAMENTO .....	58
5.1.1	Método de coleta das amostras provenientes do Hospital das Clínicas da UNESP .....	58
5.1.2	Método de coleta das amostras provenientes do Hospital Estadual de Bauru	59
5.2	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS .....	60
5.2.1	Procedimento para pesagem .....	61
5.2.2	Procedimentos para diluição de amostras.....	61
5.2.3	Análises de rotina.....	61
5.2.3.1	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva .....	62
5.2.3.1.1	Método de análise .....	63
5.2.3.2	Contagem de <i>Clostridium</i> sulfito redutor e <i>Clostridium perfringens</i> ....	64
5.2.3.2.1	Método de análise .....	66
5.2.3.3	Contagem de <i>Bacillus cereus</i> .....	66
5.2.3.3.1	Método de análises .....	67
5.2.3.4	Análise de água.....	67
5.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS.....	68
5.3.1	Análises físico-químicas de produtos cárneos .....	68
5.3.1.1	Características sensoriais .....	68

5.3.1.2	Aferição do pH.....	69
5.3.1.3	Prova de H <sub>2</sub> S - Reação para gás sulfídrico .....	70
5.3.1.4	Prova de Éber - Reação para amônia .....	71
5.3.1.5	Quantificação de lipídios pela técnica do Butirômetro .....	72
5.3.2	Análises físico-químicas do leite materno .....	72
5.3.2.1	Prova da acidez.....	73
5.3.2.2	Crematócrito do leite materno .....	73
5.3.3	Análise físico-química dos leites hospitalares .....	74
5.3.3.1	Determinação da acidez pelo método Dornic (prova quantitativa) .....	74
5.3.4	Análises físico-químicas do mel .....	75
5.3.4.1	Determinação de Acidez .....	75
5.3.4.2	Reação de Fiehe (Análise qualitativa de HMF) .....	76
5.3.4.3	Determinação de HMF .....	77
5.3.4.4	Prova de Lund .....	78
5.3.4.5	Determinação da atividade diastásica .....	78
5.3.4.6	Determinação de umidade .....	79
5.3.5	Análises físico-químicas da água .....	79
5.3.5.1	Análises Sensoriais .....	80
5.3.5.2	pH.....	80
5.3.5.3	Nitrogênio amoniacal (NA) .....	80
5.3.5.4	Dureza .....	81
5.3.5.5	Cloro residual livre (CLR) .....	83
5.3.5.6	Matéria orgânica.....	83
<b>6. CONCLUSÃO</b>	.....	<b>85</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	.....	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos é um grande desafio devido o rápido crescimento populacional. Com esse cenário fica evidente que a demanda por alimentos é enorme e que a tendência é produzir de forma cada vez mais intensiva (FAO, 2009). Porém, tão importante quanto garantir a oferta de alimentos, é assegurar uma produção com qualidade visando a saúde do consumidor. A grande preocupação que se tem sobre este fato se deve ao aumento das doenças envolvendo alimentos contaminados por patógenos e também ao aumento da complexidade da cadeia de alimentos ocasionada pela globalização (FAO, 2010).

Para que sejam oferecidos à população alimentos em quantidade e qualidade, faz-se necessário um acompanhamento deste produto desde o início de sua cadeia produtiva até a industrialização, envolvendo a transformação da matéria-prima em alimento, seu armazenamento, transporte, comércio e consumo (SANTOS et al., 2007). Como a segurança do alimento pode ser comprometida em qualquer um desses estágios da cadeia, o controle em todo o processo é essencial, assim como o comprometimento de todos os componentes da cadeia, para proteger o consumidor de possíveis doenças transmitidas por alimentos (DTA) (CAPIOTTO et al., 2010).

As DTA constituem um dos mais importantes problemas que colocam em risco a saúde pública (WELKER et al., 2010), que são causadas por agentes, os quais penetram o organismo humano através da ingestão de água ou alimentos previamente contaminados (AMSON et al., 2006), de difícil detecção por não apresentarem mudanças de cor e sabor, mostrando-se como um alimento normal (AMSON et al., 2006; FORSYTHE, 2002).

No Brasil, a epidemiologia das DTA ainda é pouco conhecida e carente, onde apenas alguns estados e municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os principais agentes envolvidos, alimentos e fatores contribuintes mais comuns (AMSON et al., 2006). Isso ocorre porque a maioria dos casos não é notificada, pois muitos organismos patogênicos causam sintomas brandos (MARCHI et al., 2011; FORSYTHE, 2002), fazendo com que as vítimas não busquem por tratamento médico.

As análises microbiológicas de alimentos são indispensáveis para a detecção do micro-organismo mais provável no caso de um episódio de toxinfecção alimentar (RODRIGUES, 2011; SILVA JUNIOR, 2005; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Além disso, é fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, os riscos que esse alimento pode oferecer à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida útil pretendida. A análise laboratorial é imprescindível também para monitorar medidas corretivas em pontos críticos de controle ou ainda, verificar se os alimentos estão dentro de seus padrões de identidade e qualidade (SILVA JUNIOR, 2005; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Em razão dos avanços tecnológicos na ciência dos alimentos, tanto nos aspectos toxicológico como de identidade e qualidade, tornam-se imperativa a necessidade da modernização e a contínua atualização dos métodos analíticos (LUTZ, 2008). Métodos clássicos também chamados de convencionais, podem levar à liberação de lotes de alimentos impróprios para consumo por demandar dias para conclusão das análises (RODRIGUES et al., 2011).

Este relatório discorre sobre as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular supervisionado, na área de Inspeção e Microbiologia de Produto de Origem Animal, em dois laboratórios diferentes, no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – LIPOA – da UEL, de 05 de agosto a 06 de setembro de 2013 e no Serviço de Orientação à Alimentação Pública – SOAP – da UNESP, Campus de Botucatu, no período de 09 de setembro a 15 de novembro de 2013.

No período de estágio foi realizado o acompanhamento da preparação do material e meios de cultura utilizados, execução de diversas análises microbiológicas e físico-químicas, realização de visita técnica, discussão de artigos e acompanhamento de projetos de pesquisas desenvolvidos no laboratório.

## **PARTE 1 - UEL**

### **2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO**

No período compreendido entre 05 de agosto à 06 de setembro de 2013, parte do estágio supervisionado foi realizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL), totalizando 200 horas, no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) , tendo como orientadora a Professora Doutora Vanerli Beloti. O laboratório realiza análises microbiológicas e físico-químicas de leite e derivados para toda região de Londrina e cidades vizinhas.

A UEL tem como missão a gestão democrática, com plena autonomia didático-científica, comprometida com o desenvolvimento e a transformação social, econômica, política e cultural do Estado do Paraná e do Brasil (UEL, 2013). O departamento de Medicina Veterinária tem como estrutura administrativa setores que incluem clínicas de pequenos e grandes animais, assim como os de radiologia, morfologia, patologia clínica, parasitologia, inspeção de produtos de origem animal, unidade de estudo e sanidade avícola, reprodução, fisiologia, imunologia, histopatologia e farmacologia, sendo que o de escolha para a realização do estágio foi no setor de Medicina Veterinária Preventiva, como citado anteriormente.

O LIPOA se encontra no Hospital Veterinário, no Centro de Ciências Agrárias, no *Campus* da UEL. Desde 1990 presta serviços em análises físico-químicas e microbiológicas de leite e derivados, bem como consultorias a produtores, órgãos públicos e indústrias de laticínios, na área de qualidade do leite (UEL, 2013). Além da professora e do técnico responsável, tem como integrantes três mestrandos, três doutorandos, estagiários de diferentes períodos do curso e alunos de iniciação científica e quatro médicos veterinários residentes que atuam na rotina laboratorial.

Mensalmente são realizadas análises de aproximadamente 33 amostras de leite apreendidos pela vigilância sanitária e provenientes dos laticínios da região e 3 amostras de iogurte e queijo. As análises microbiológicas e físico-químicas são requeridas com o intuito de garantir a qualidade e segurança dos produtos frente ao consumidor.

## 2.1 ÁREA FÍSICA

### 2.1.1 Sala de permanência

A unidade conta com uma sala de estudos sendo a mesma destinada aos residentes, alunos de iniciação científica e de pós-graduação, técnico e professora (Figura 1).



FIGURA 1. Sala de permanência (Fonte: Arquivo pessoal).

### 2.1.2 Sala de recepção de amostras

No prédio encontra-se uma sala específica para o recebimento de amostras e atendimento ao cliente (Figura 2).

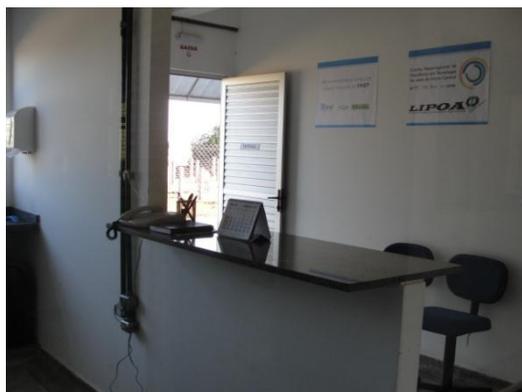


FIGURA 2. Sala de recepção (Fonte: Arquivo pessoal).

### 2.1.3 Sala de preparo de material

O laboratório possui uma sala de preparo de meios e de todo material utilizados na rotina e na pesquisa microbiológica (Figura 3). É equipada com pia, duas geladeiras utilizadas para o estoque dos meios, micro-ondas, mesa, armário, uma estufa para secagem de material autoclavado e uma estufa para prova de esterilidade dos meios autoclavados. Dentro da sala de preparo de material há uma sala com uma autoclave para esterilização do material utilizado na rotina (Figura 4) e uma pia, e uma sala específica para distribuição de meios (Figura 5).



FIGURA 3. Sala de preparo de material (Fonte: Arquivo pessoal).



FIGURA 4. Autoclave de material limpo (Fonte: Angela Toledo Bach).



FIGURA 5. Sala de distribuição de meios (Fonte: Arquivo pessoal).

### 2.1.4 Sala de descarte e lavagem de material contaminado

Esta sala contém uma autoclave e uma geladeira para material contaminado, além de pias para lavagem da vidraria, e duas estufas com diferentes temperaturas

para secagem da vidraria utilizada na rotina (Figura 6). Nessa sala também há um destilador de água.



FIGURA 6. (a) Sala de lavagem de material. (b) Autoclave e geladeira para material contaminado (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 2.1.5 Sala de análises físico-químicas

A sala possui uma bancada, uma mesa, armários onde se encontra a maioria dos reagentes e vidrarias utilizadas nas análises de rotina, centrífuga de Gerber, banho-maria, crioscópio eletrônico, além de uma pia (Figura 7).



FIGURA 7. Sala de análises físico-químicas (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 2.1.6 Sala de Paramentação

Local utilizado para a troca de jaleco e higienização das mãos antes e depois de qualquer etapa da análise dos produtos (Figura 8).



FIGURA 8. Sala de paramentação (Fonte: Arquivo pessoal).

### 2.1.7 Capela

Sala onde são realizadas as etapas iniciais de todas as análises microbiológicas. Possui uma balança, um homogeneizador tipo “stomacher” e bicos de Bunsen nas bancadas (Figura 9).



FIGURA 9. Capela (Fonte: Arquivo pessoal).

### 2.1.8 Sala de Incubação

Área dotada de 3 estufas bacteriológicas e banho-maria. Esta sala é destinada à incubação dos meios e à leitura dos mesmos (Figura 10).



FIGURA 10. Sala de incubação (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 2.1.9 Sala de repique

Local utilizado para continuação das análises microbiológicas que envolve a utilização de meios contaminados. É dotado de bancadas com bicos de Bunsen e um fluxo laminar (Figura 11).

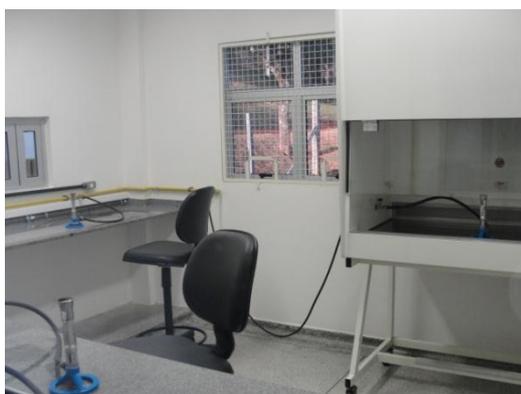


FIGURA 11. Sala de repique (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 2.1.10 Sala de armazenamento de amostra

Sala destinada ao armazenamento das amostras de produtos analisados em projetos e estoque das culturas isoladas (Figura 12).



FIGURA 12. Armazenamento de amostras e culturas isoladas (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 2.1.11 Almoxarifado

Há um almoxarifado onde são estocados os materiais necessários para o andamento da rotina (Figura 13).



FIGURA 13. Almoxarifado (Fonte: Arquivo pessoal).

### **3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

Durante o estágio foram desenvolvidas diversas atividades da rotina laboratorial, como preparação de meios, lavagem e preparação de material para as análises, descarte e lavagem de material contaminado, análises microbiológicas e físico-químicas, realização de provas para detecção de fraudes em leite, além de acompanhamento das aulas teóricas e práticas da disciplina de inspeção de leite e derivados.

#### **3.1 RECEPÇÃO E CADASTRO DE AMOSTRAS**

Todas as amostras recebidas no laboratório eram cadastradas em uma ficha onde constava dados como data de fabricação, validade, temperatura de chegada ao laboratório (sendo rejeitado produtos congelados ou com temperatura maior que 10°C), qual análise seria submetida e recebiam um número de identificação. Então eram imediatamente armazenadas sob refrigeração até o início das análises.

O LIPOA é um dos laboratórios credenciados para a realização de análises das amostras de leite proveniente do programa "Leite das crianças - diminuição da desnutrição infantil" desenvolvido no âmbito do Estado do Paraná, na forma do Decreto Estadual nº 1279, de 14 de maio de 2003 (PARANÁ, 2003).

Amostras de leite pertencentes ao programa eram apreendidas periodicamente pela vigilância de saúde nas escolas e encaminhadas sob refrigeração ao laboratório. Na recepção deste produto era verificado se a embalagem da coleta estava lacrada e anotava-se o número de apreensão contida na mesma. Posteriormente, era realizado o cadastro igualmente ao que foi descrito.

#### **3.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS**

##### **3.2.1 Preparo da amostra**

###### **3.2.1.1 Leite e derivados líquidos**

Antes da abertura da embalagem era feito a homogeneização da amostra através de agitação manual, e posteriormente era feita a assepsia da mesma usando algodão embebido em álcool 70% iodado. Todo o procedimento era realizado na capela após prévia higienização, que era realizada com água,

detergente e álcool 70% seguido de desinfecção superficial por radiação de luz ultravioleta por 15 min.

### 3.2.1.2 Produtos lácteos sólidos

Na capela, após correta desinfecção, era realizado a assepsia da embalagem usando algodão e álcool 70% iodado. Com auxílio de pinças e facas previamente flambadas era pesado  $25 \pm 0,2$  g da amostra, colhida de vários pontos seguido de uma homogeneização 60 segundos em "stomacher". A cada amostra pesada flambava-se o instrumental, devendo ao final da pesagem este ser destinado ao setor de lavagem (LIPOA, 2013).

### 3.2.2 Procedimentos para diluição de amostras

Diluição é o procedimento de adição de uma substância a outra como o objetivo de reduzir a concentração de uma das substâncias (BRASIL, 2003). Em alimentos, o objetivo de se fazer diluições nas análises microbiológicas é permitir, na contagem de placas, a obtenção de placas com número de colônias entre 25 e 250 ou 15 e 150 na contagem de bolores e leveduras, e na contagem pelo método do Número Mais Provável (NMP) obter tubos positivos nas menores diluições e negativos nas maiores (SILVA et al., 2007).

Para a obtenção de resultados corretos de contagem de micro-organismos em amostras de alimentos, a homogeneização de todas as diluições é um ponto fundamental. Quando feita inadequadamente poderá acarretar diferenças muito grandes na contagem das colônias e resultados incoerentes quando o uso de duas ou mais diluições sucessivas. A homogeneização da diluição inicial (amostra/diluyente) deverá ser realizada em "stomacher" entre 30 segundos a 2 minutos, dependendo do tipo de amostra. A homogeneização das diluições subsequentes deverá ser realizada com o auxílio de agitador de tubos, por um período de tempo não superior a 1 minuto (BRASIL, 2003).

#### 3.2.2.1 Leite e derivados líquidos

A diluição de  $10^{-1}$  era obtida transferindo-se 1 mL da amostra para um tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% e homogeneizando-se a mistura

em agitadores de tubos tipo "vortex". A partir  $10^{-1}$  preparava-se as diluições necessárias (BRASIL, 2003).

### 3.2.2.2 Produtos lácteos sólidos

A diluição de  $10^{-1}$  era obtida transferindo-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1% para sacos plásticos para "stomacher" contendo  $25 \pm 0,2$  g da amostra. Após a homogeneização por 60 segundos em "stomacher", era preparada as demais diluições, transferindo-se 1 mL da diluição para um tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% (BRASIL, 2003).

### 3.2.3 Análise de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM)

Os mesófilos incluem um grupo de micro-organismos capazes de se multiplicar numa faixa de temperatura que varia de 20 a 45°C e, portanto, são encontrando nas temperaturas ambientes de países tropicais, onde possuem condições ótimas para sua multiplicação (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Esses micro-organismos indicam a qualidade com que o alimento foi obtido ou processado, e sua presença em altas contagens é indicativa de procedimento higiênico inadequado na produção, no beneficiamento ou na conservação, dependendo da origem da amostra (FRANCO; LANGRAF, 1996).

Além disso, as contagens podem ser utilizadas para determinar a aceitabilidade sensorial, pode ser utilizado como indicador de segurança (PONCIANO, 2010), uma vez que se deve considerar que as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, e portanto, uma alta contagem de AM pode significar que houve condições para o crescimento de patógenos (FRANCO & LANDGRAF, 1996; LIPOA, 2013), e servem para verificação dos padrões de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, leite tipo A e pasteurizado (BRASIL, 2011).

#### 3.2.3.1 Método de análise

Após o preparo e as diluições da amostra, realizava-se a semeadura em profundidade (*pour plate*). Em placa de Petri estéril era semeado 1 mL de cada

diluição selecionada, posteriormente era adicionado cerca de 15 a 20 mL de ágar padrão para contagem (PCA), fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C. Em seguida era feito a homogeneização de cada placa com movimentos leves e deixado em superfície plana até se solidificar. As placas eram incubada invertidas em estufa bacteriológica a 35-37°C/48 h (BRASIL, 2003).

Transcorrido o tempo de incubação, fazia-se a contagem do número de colônias (Figura 14). Para leitura era utilizado mais de uma placa, geralmente uma duplicata da mesma diluição, que continham entre 25 e 250 colônias (LIPOA, 2013). Multiplicando o número de colônias contadas pelo inverso da diluição, tinham-se os resultados que eram expressos em UFC/g ou mL (Unidade Formadora de Colônia por grama ou mililitro) (BRASIL, 2003).

Para a enumeração de mesófilos, pode-se utilizar como alternativa o método do Petrifilm™ AC, método rápido de detecção e contagem a partir de sistemas prontos de meio de cultura que contém diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores adequados à recuperação de cada tipo de micro-organismo pesquisado. A análise microbiológica fica reduzida a três etapas simples e rápidas, que fornecem resultados consistentes e de fácil leitura, reduzindo as chances de erros, comuns nos métodos convencionais de plaqueamento (3M, 2013).

Na contagem de micro-organismos AM no Petrifilm™ AC, o indicador de cor cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) cora todas as colônias, através de sua redução, originando formazano que fica acumulado no interior dos grânulos das células tornando-as vermelhas (SOAP, 2009) (Figura 15).



FIGURA 14. Placa de micro-organismos mesófilos em PCA (Fonte: Cibeli Viana).

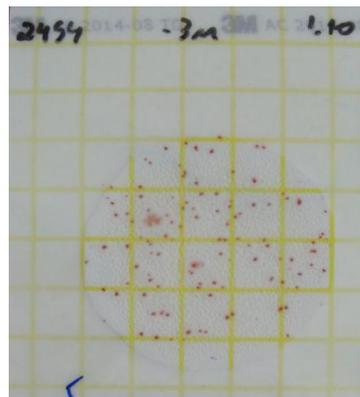


FIGURA 15. Placa de Petrifilm™ AC (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 3.2.4 Determinação do NMP de coliformes a 35°C e a 45°C

Os coliformes são micro-organismos pertencentes à família Enterobacteriaceae que, quando presentes no alimento em certos níveis, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, provável presença de patógenos, deterioração do alimento, além de poder indicar deficiências higiênicas durante o processamento ou armazenamento do produto (SOAP, 2009).

O grupo dos coliformes a 35°C (ou totais) compreende os micro-organismos bastonetes gram negativos, não formadores de esporos, fermentadores de lactose com produção de gás quando incubados em temperaturas entre 35 e 37°C por 48 h. As bactérias predominantemente pertencentes ao grupo são dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (FRANCO & LANDGRAF, 2005; CARVALHO, 2010).

Apenas a *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal de humanos e animais. Os demais podem estar presentes em outros ambientes como vegetais e solo, além de fezes (contaminação ambiental). Assim, a presença de coliformes totais em um alimento não significa necessariamente contaminação fecal ou ocorrência de enteropatógeno (FRANCO & LANDGRAF, 1996), mas é considerado como um indicador do nível de contaminação ambiental que o alimento agregou durante sua elaboração (TAMANINI et al., 2007).

O grupo dos coliformes a 45°C corresponde aos coliformes a 35°C que apresentam a capacidade de continuar fermentando a lactose com produção de gás

a temperaturas entre 44,5 e 45,5°C (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Em princípio, esta definição objetivou selecionar apenas os coliformes originários do trato gastrointestinal. No entanto, atualmente sabe-se que o grupo de coliformes termotolerantes inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo que os dois últimos gêneros possuem cepas de origem não entéricas (SOAP, 2009).

Por esse motivo, a presença de coliformes termotolerantes em alimentos é menos representativa como indicador de contaminação fecal do que a enumeração direta de *E.coli*. Entretanto, é muito mais significativa do que a presença de coliformes a 35°C, dada a alta porcentagem de *E.coli* compondo o grupo fecal (SOAP, 2009).

A pesquisa de coliformes termotolerantes e *E.coli* nos alimentos fornece com maior segurança informações sobre as condições higiênicas do produto e da possível presença de enteropatógenos, sendo assim, considerado um indicador higiênico-sanitário (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

#### 3.2.4.1 Método de análise

Esta análise era feita segundo a Instrução Normativa (IN) 62 (BRASIL, 2003) (Figura 16):

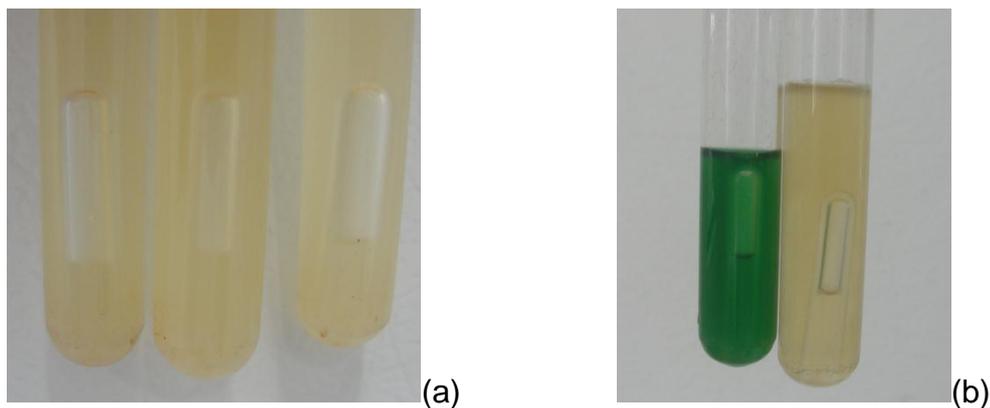


FIGURA 16. (a) Resultado positivo na prova presuntiva. (b) Resultado positivo na prova confirmativa para coliformes a 35°C e 45°C (Fonte: Arquivo pessoal).

- Prova presuntiva: Baseia-se na inoculação da amostra em caldo lauril sulfato de sódio (LST), em que a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan, decorrente da fermentação de lactose presente no meio. O caldo LST apresenta, em sua composição, uma mistura de fosfatos que lhe

confere um poder tamponante, impedindo a sua acidificação. A seletividade do meio se deve à presença do lauril sulfato de sódio, um agente surfactante aniônico que atua na membrana citoplasmática de micro-organismos gram positivos, inibindo o seu crescimento.

A partir da diluição  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  (alimentos sólidos e pastosos) ou  $10^0$ ,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  (alimentos líquidos), inoculava-se volumes de 1 mL em séries de 3 tubos contendo 10 ml de caldo LST, em concentração simples, com tubo de Durhan invertido. A leitura era feita após 48 horas de incubação a 35-37°C. A presença de gás nos tubos de Durhan (mínimo 1/10 do volume total do tubo) indicava a presença presuntiva de coliformes. E, então, era feita a prova confirmativa.

- Prova confirmativa para coliformes a 35°C: A confirmação era feita por meio da inoculação dos tubos positivos no caldo LST para a fermentação de lactose em caldo verde brilhante bile lactose 2% (VBBL) e posterior incubação a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . A presença de gás nos tubos de Durhan do caldo VBBL (mínimo 1/10 do volume total do tubo) evidenciava a fermentação da lactose presente no meio. O caldo apresentava, em sua composição, bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição dos micro-organismos gram positivos.

- Prova confirmativa para coliformes a 45°C: A confirmação da presença de coliformes termotolerantes era feita por meio da inoculação em caldo EC, com incubação em temperatura seletiva de  $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$  a partir dos tubos positivos obtidos na prova presuntiva. A presença de gás nos tubos de Durhan evidenciava a fermentação da lactose presente no meio. O caldo EC apresentava em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante, impedindo a sua acidificação. A seletividade do meio se deve à presença de sais biliares, responsáveis pela inibição dos micro-organismos gram positivos.

### 3.2.5 Pesquisa de *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos gram negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos e a maioria é móvel devido a presença de flagelos peritríquios (exceção feita à *S. pullorum* e *S. gallinarum*) (CARVALHO, 2010). A taxonomia é baseada na

composição de seus antígenos de superfícies, que são antígenos somáticos (O), flagelares (H) e os capsulares (Vi) (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

São quimiorganotróficos com habilidade de metabolizar nutrientes através da via respiratória e fermentativa. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C. Catabolizam a glicose e outros carboidratos com produção de ácido e gás, são oxidase negativa, catalase positiva, crescem em presença de citrato como única fonte de carbono, a maioria produz ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), descarboxila a lisina e a ornitina. Não hidrolisam a uréia (SOAP, 2009).

É um micro-organismo amplamente distribuído na natureza, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios naturais. Entre os animais as aves constituem o principal reservatório, mas suínos, bovinos, equinos, outros mamíferos domésticos e silvestres, bem como répteis, também apresentam *Salmonella* (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

As bactérias desse gênero são importantes agentes causadores de DTA em humanos, sendo a maioria dos casos associada ao consumo de produtos de origem animal (SCALLAN et al., 2011), sobretudo produtos avícolas (REITER et al., 2007). As formas de bacteremias com focos de infecção extra-intestinal localizados, são menos frequentes. Dentre os micro-organismos do gênero *Salmonella* adaptados ao homem destaca-se a *S. enterica* sorotipo Typhi, agente da febre tifóide, doença infecciosa aguda e sistêmica, e *S. enterica* sorotipo Paratyphi, agente da febre entérica (LOUREIRO, 2007).

A febre tifóide é normalmente transmitida por água e alimentos contaminados com material fecal humano (FRANCO & LANDGRAF, 2002), sendo constantemente associada a baixos níveis socioeconômicos, relacionando-se, principalmente, com precárias condições de saneamento e de higiene pessoal e ambiental. A sintomatologia clínica clássica consiste em febre alta, cefaléia, mal-estar geral, dor abdominal, falta de apetite, bradicardia relativa (dissociação pulso-temperatura), esplenomegalia, manchas rosadas no tronco, diarréia e tosse seca (BRASIL, 2008).

Atualmente, o quadro clínico completo é de observação rara, sendo mais frequente um quadro em que a febre é a manifestação mais expressiva, acompanhada por alguns dos demais sinais e sintomas citados (BRASIL, 2008).

Algumas pessoas podem se tornar portadoras durante muito tempo, mesmo após o desaparecimento dos sintomas, tornando-se fontes importantes de contaminação (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

As febres entéricas causadas pelos sorotipos *Salmonella* Paratyphi A, B e C (SOAP, 2009), causam um quadro bastante semelhantes à febre tifóide, mas os sintomas clínicos são mais brandos. Também só acometem os seres humanos, sendo igualmente transmitidas pelo consumo de água e alimentos contaminados, especialmente leite cru, vegetais crus, mariscos e ovos (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

A enterocolite, também conhecida como salmonelose, é uma das zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle, cuja transmissão direta de pessoa a pessoa não é comum. Embora todos os micro-organismos pertencentes ao gênero possam ser reconhecidas como um patógeno potencial, algumas responsáveis por infecção no homem, estão presentes no intestino de aves saudáveis, sem detrimento para o hospedeiro sendo, porém, capazes de contaminar o meio ambiente e outras aves, através das fezes (PREBAF, 2008).

A dose infectante varia de  $10^5$  a  $10^8$  células, porém em pacientes imunocomprometidos têm sido observadas doses  $\leq 10^3$  células para alguns sorovares envolvidos em surtos de DTA. A manifestação clínica geralmente resultam em gastroenterites auto-limitadas que incluem sintomas como dores abdominais, náuseas, vômito, diarreia, febre moderada e dores de cabeça, tratadas apenas nos casos de pacientes imunodeprimidos, neonatais e idosos, ou pacientes com febre entérica e septicemia (PREBAF, 2008; TEO & OLIVEIRA, 2005) e não sendo requerida nos casos de diarreias agudas em paciente hígidos.

Contudo a utilização rotineira e indiscriminada dos antibióticos tem levado ao aparecimento de populações bacterianas resistentes (PREBAF, 2008). Fato este agravado devido à utilização dos medicamentos tanto para tratar ou prevenir a ocorrência de doenças infecciosas quanto como aditivos, neste caso visando melhorar o desempenho zootécnico de animais de produção (CARDOSO et al., 2006; RIBEIRO, 2006).

### 3.2.5.1 Método de análise

A técnica tradicional de detecção de *Salmonella* em alimentos foi desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações extremamente desfavoráveis, como é o caso de alimentos com uma microbiota competidora muito maior do que a população de *Salmonella*, alimentos em que as células se encontrem em número muito reduzido ou injuriadas pelo processo de conservação, como a aplicação de calor, o congelamento e a secagem, por exemplo (SOAP, 2009).

Esta análise era realizada com base na IN 62 (BRASIL 2003), a qual segue basicamente quatro etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo diferencial, confirmação por triagem bioquímica e sorologia:

- Pré-enriquecimento não seletivo: esse procedimento visa minimizar os efeitos do processamento industrial dos alimentos, capaz de promover estresse nas células de *Salmonella*, sem inativá-las biologicamente.

Assim, diluía-se 225 mL de água peptonada tamponada 1% (APT) em 25 g das amostras sólidas ou pastosas e 25 mL das amostras líquidas, incubando a mesma a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$  / 16 a 20 horas. A utilização do APT, favorece a manutenção do pH (Potencial Hidrogeniônico), evitando que as bactérias acompanhantes acidifiquem o meio, prejudicando a recuperação das células de *Salmonella*.

- Enriquecimento em caldo seletivo: objetiva inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella*, a partir da incubação da amostra pré-enriquecida em caldo seletivo, por 18 a 24 horas. Nesta etapa, recomenda-se a utilização de dois diferentes meios de enriquecimento, porque a resistência de *Salmonella* aos agentes seletivos varia de cepa para cepa (SILVA et al., 2007) .

O enriquecimento seletivo era feito obrigatoriamente nos meios líquidos seletivos, caldo Rappaport Vassiliadis (RV), cuja presença de verde malaquita e de cloreto de magnésio, associada à temperatura de incubação, atuam como agentes seletivos da microbiota acompanhante, enquanto a presença de peptona de farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella*, e o caldo selenito-cistina (SC), onde o agente inibidor é o selenito de sódio que atua inibindo os coliformes e enterococos.

Assim, era transferido uma alíquota 0,1mL do APT inoculando-a em 10 mL de RV e outra alíquota de 1mL para 10 mL de caldo SC. Os tubos eram incubados em banho-maria por 24 a 30 horas a  $41 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

- Plaqueamento seletivo diferencial: objetiva promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella*, com características típicas que as distingam dos competidores, para posterior confirmação sorológica e bioquímica. Assim como na etapa de enriquecimento seletivo, recomenda-se que o plaqueamento diferencial seja feito em mais de um tipo de meio de cultura (SILVA et al., 2007).

Para essa etapa, de cada meio de enriquecimento seletivo transferia-se uma pequena alíquota com auxílio de alça bacteriológica de níquel-cromo ou platina, pela técnica de esgotamento superficial no ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) e no ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) . As placas eram incubadas a  $35-37^{\circ}\text{C}/24\text{ h}$  (Figura 17).

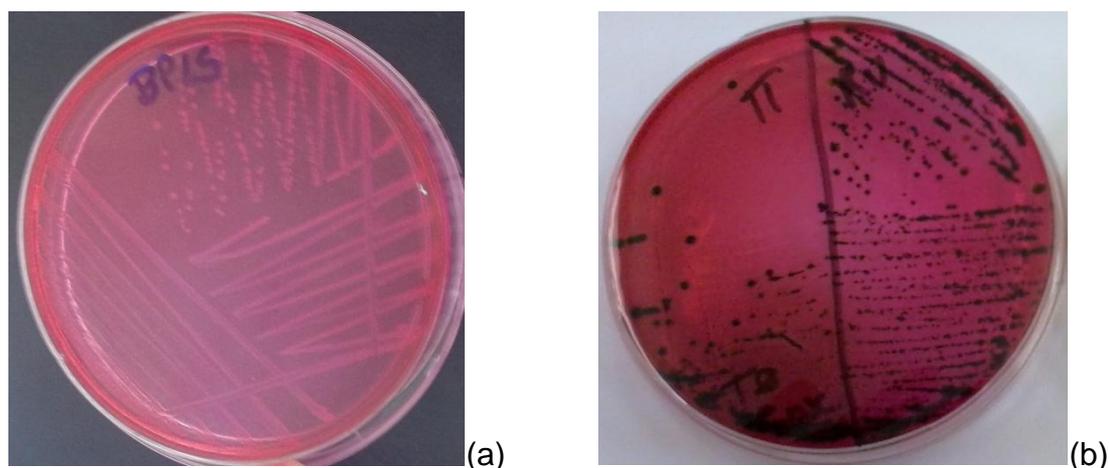


FIGURA 17. (a) Placa de micro-organismo do gênero *Salmonella* em BPLS (b) Placa de micro-organismo do gênero *Salmonella* em XLD ( Fonte: Arquivo pessoal).

O BPLS apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição de micro-organismos gram positivos e o XLD se baseia na fermentação da xilose, descarboxilação de lisina e produção de  $\text{H}_2\text{S}$  para diferenciação primária de *Salmonella* spp. de bactérias não patogênicas, e como agentes inibidores da flora competitiva o meio apresenta o desoxicolato de sódio.

- Confirmação: objetiva verificar se as colônias típicas obtidas nas placas são realmente colônias de *Salmonella*, através de provas bioquímicas e sorológicas. (SILVA et al., 2007).

Inicialmente as colônias típicas no plaqueamento diferencial eram repicadas com ajuda de agulha de níquel-cromo ou platina, com inoculação profunda e estriamento na superfície do bisel no ágar Lisina Ferro (LIA) e no ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI). Posteriormente os tubos eram incubados a 35-37°C/24 h.

Durante as primeiras 8-12 horas de incubação o TSI se encontrava amarelo pela utilização de glicose como fonte de energia. Porém como esse nutriente encontra-se em baixa concentração no meio, as colônias de *Salmonella* começam a degradar os aminoácidos liberando aminas, responsáveis pela alcalinização do meio (apresentando coloração vermelha pela viragem do indicador de vermelho de fenol), do bisel para a base, pois a degradação de aminoácidos é facilitada na presença de oxigênio. Juntamente com essas reações, ocorre a liberação de enxofre no meio que junto com o hidrogênio ali encontrado forma H<sub>2</sub>S (escurecimento do meio).

O meio LIA propicia a verificação da descarboxilação da lisina pela alcalinização do meio. Inicialmente, a bactéria fermenta a glicose presente como fonte de energia para seu desenvolvimento, acidificando o meio que torna-se amarelo pela viragem do indicador de púrpura de bromocresol. Como a *Salmonella* produz a enzima lisina-descarboxilase, ativada pela acidificação do meio, a lisina presente é degradada, produzindo cadaverina e CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono), originando metabólitos alcalinos. Desta forma o meio passa de amarelo para a cor violeta. Portanto, esperava-se a cor roxa para o tubo positivo, sendo essa a mesma cor do meio antes de ser inoculado, com produção de H<sub>2</sub>S.

Culturas características nos meios TSI e LIA, eram submetidos à sorologia, onde utilizava-se o soro polivalente para confirmação do gênero, aplicando-se para isso a técnica recomendada pelo fabricante, e à testes bioquímicos complementares para confirmação definitiva da identidade.

Uma alçada das colônias que apresentaram positividade na sorologia era transferida a uma bateria de testes em tubos contendo: caldo uréia (teste da

urease), caldo malonato (teste do malonato), caldo triptose (teste indol), caldo MRVP - Methyl Red and Voges Proskauer (teste vermelho de metila - fermentação glicose via ácida mista, e teste Voges-Proskauer - fermentação da glicose via butilino-glicólica) e ágar Citrato de Simmons (teste da utilização do citrato como fonte única de carbono) (Tabela 1). Após as colônias serem repicadas para os meios citados, era feita a incubação a 35-37°C por 24 h.

TABELA 1: Provas bioquímicas e resultados esperados para caracterização de *Salmonella* sp.

Teste bioquímico	Reação
Urease	-
Malonato	-
Indol	-
VM	+
VP	-
Citrato	+

Após a verificação da combinação de resultados das provas bioquímicas e sorológicas indicava-se o resultado como presença ou ausência de *Salmonella* em 25 g ou mL da amostra.

### 3.3ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS

#### 3.3.1 Determinação do ponto de congelamento (índice crioscópico ou crioscopia)

O índice crioscópico (IC) é definido como a temperatura em que o leite passa do estado líquido para o estado sólido (TRONCO, 2008; BRASIL, 2003), que é determinado predominantemente pelas substâncias que estão em solução, ou seja, substâncias que se dissolvem perfeitamente na água (LIPOA, 2013). Tem por

finalidade a detecção de fraudes por adição de água (TRONCO, 2008) e deve estar entre  $-0,530$  e  $-0,550^{\circ}$  Hortvet (o que corresponde entre  $-0,512$  e  $-0,531^{\circ}\text{C}$ ) (BRASIL, 2011).

O ponto de congelamento do leite pode apresentar pequenas variações de acordo com: período de lactação, estação do ano, clima, latitude, alimentação, raça, doenças dos animais e processos de pasteurização, estado de conservação da matéria-prima, entre outros (TRONCO, 2008).

O IC do leite fraudado com água tende a aproximar-se de  $0^{\circ}\text{C}$ , ponto de congelamento da água (LUTZ, 2005), fraude esta que tem como objetivo aumentar o volume da produção, muitas vezes acompanhado de fraudes por reconstituíntes (solutos) na tentativa de mascarar a adição de água, ou o objetivo de trazer a acidez para parâmetros normais bem como o IC, uma vez que a acidez proveniente da degradação de lactose aprofunda o ponto de congelamento (LIPOA, 2013).

A adição de água ao leite não só reduz a qualidade do mesmo, como também pode ocasionar contaminação dependendo da qualidade da água adicionada, representando um risco à saúde do consumidor (LUTZ, 2005).

#### 3.3.1.1 Método de análise

O IC é aferido através de um aparelho chamado crioscópio, aparelho capaz de reconhecer a concentração das substâncias em solução em relação a quantidade de água normal do leite (LIPOA, 2013).

Após a calibração do aparelho, pipetava-se, em triplicata, 2,5mL de leite em tubos específicos. Posteriormente, colocava-se o tubo no crioscópio, o qual super-resfriava a amostra até  $-3^{\circ}\text{C}$ , seguida de imediata cristalização da amostra induzida por vibração mecânica. Isto produz uma elevação rápida de temperatura da amostra de leite, com consequente liberação de calor de fusão, até alcançar um "plateau" que corresponde ao IC (TRONCO, 2008). Após cada leitura, que entre as triplicatas devia ser próximo, aceitando uma tolerância de mais ou menos 2 miligráus ( $\pm 0,002^{\circ}\text{H}$ ), calculava-se a média, determinando assim o valor do IC.

Internacionalmente, o resultado é expresso em escala de graus Horvert ( $^{\circ}\text{H}$ ), ligeiramente diferente da escala de graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), estando ambas correlacionadas pelas equações:

$$^{\circ}\text{H} = 1,03562 \times ^{\circ}\text{C} \qquad ^{\circ}\text{C} = 0,9656 \times ^{\circ}\text{H}$$

Nas fraudes por aguagem, o cálculo da porcentagem de água adicionada pode ser feito pela equação:

$$\% \text{ água} = (0,550 - L) \times 1,82 \times 100$$

L = leitura do ponto de congelamento da amostra

### 3.3.2 Pesquisa de peroxidase

O leite contém várias enzimas que atuam como catalisadores bioquímicos, provocando importantes modificações em baixas concentrações. As enzimas chegam ao leite através da glândula mamária e ainda através de micro-organismos. Uma das enzimas de maior interesse na prática rotineira das indústrias é a peroxidase, amplamente utilizada para verificar o grau de aquecimento que o leite foi submetido durante o processo de pasteurização (TRONCO, 2008).

A pasteurização do leite consiste no emprego de calor com a finalidade de destruir totalmente a microbiota patogênica, sem causar alteração sensível da constituição física e do equilíbrio químico do leite, sem prejuízo dos seus elementos bioquímicos, assim como suas propriedades organolépticas normais (LIPOA, 2013). Os processos de pasteurização permitidos pela legislação para o leite são: pasteurização lenta ( $62\text{-}65^{\circ}\text{C}$  por 30 min) e pasteurização rápida ( $72\text{-}75^{\circ}\text{C}$  por 15-20 seg) (BRASIL, 2011).

A peroxidase é uma enzima oxidante, capaz de liberar o oxigênio do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{peroxidase} = \text{H}_2\text{O} + \text{O}$ ), sendo inviabilizada somente sob temperatura superior a  $75^{\circ}\text{C}$  por mais de 20 seg (LUTZ, 2005), possibilitando, assim, o uso para verificação se ocorreu o superaquecimento durante o tratamento térmico.

### 3.3.2.1 Método de análise

Inicialmente era realizada a prova oficial modificada que consistia em transferir 2 mL de leite da amostra para um tubo de ensaio e adicionar cuidadosamente 2 mL de solução hidroalcoólica de guaiacol a 1%, formando uma sobrecamada no leite, e a adição de 3 gotas da solução de peróxido de hidrogênio a 3%, seguida da leitura da prova (LIPOA, 2013).

Se a pesquisa revelasse um anel salmão (róseo) a marrom pouco abaixo da superfície do leite, o resultado do teste era considerado positivo; em caso contrário, se o leite permanecesse branco, realizava-se a prova oficial, que consistia em transferir 10 mL da amostra para o tubo e submeter ao aquecimento em banho-maria a 45°C por 5 min, para a ativação da enzima. Posteriormente, acrescentava-se cuidadosamente 2 mL da solução de guaiacol 1% e 3 gotas da solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Se a leitura revelasse o anel salmão (róseo) a marrom, o teste era considerado como positivo. Se o leite permanecesse branco, o resultado do teste era considerado negativo, considerando, portanto, que o leite foi superaquecido. Amostras que foram devidamente pasteurizadas devem apresentar-se positivas para esta prova (LIPOA, 2013).

O método de análise oficial modificada demonstra um bom resultado onde quase a totalidade das amostras positivas apresentavam reação mesmo sem o aquecimento. Então o aquecimento era realizado como confirmatório, apenas para amostras com resultado negativo, conferindo maior velocidade às análises (LIPOA, 2013).

A metodologia descrita utiliza como base a capacidade da enzima desdobrar a água oxigenada e liberar o oxigênio ativo, o qual pode fixar-se em uma substância oxidável, como o guaiacol, produzindo a oxidação salmão (rosada) (TRONCO, 2008) (Figura 18).



FIGURA 18. Tubos com a presença da enzima peroxidase (Fonte: Arquivo pessoal).

### 3.3.3 Pesquisa de fosfatase alcalina

Outra enzima de grande interesse na prática rotineira das indústrias é a fosfatase alcalina, enzima naturalmente encontrada no leite, cuja finalidade é catalisar a hidrólise de fosfatos orgânicos em álcool ou fenol e ácido fosfórico, facilmente detectado mediante reações colorimétricas. Esta enzima é destruída pelo calor produzido no processo de pasteurização, sendo portanto, assim como a peroxidase, utilizada como parâmetro para avaliação da eficiência do tratamento térmico do leite, no chamado “perfil enzimático do leite”. A destruição desta enzima assegura a destruição dos patógenos, garantindo a inocuidade do leite (TRONCO, 2008).

#### 3.3.3.1 Método de análise

A pesquisa de fosfatase alcalina é realizada através de kits, cujo princípio do teste é baseado na alteração colorimétrica. No mercado, existe inúmeros kits, sendo assim a técnica realizada conforme a orientação do fabricante.

No laboratório, utilizava-se o método colorimétrico da fosfatase alcalina – BIOCLIN. Era adicionado 50  $\mu\text{L}$  do substrato e 500  $\mu\text{L}$  da solução padrão. Posteriormente pipetava-se 50  $\mu\text{L}$  da amostra do leite e incubava por 10 minutos em banho-maria a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Por fim, adicionava-se 2000  $\mu\text{L}$  do reagente de cor. Se a pesquisa revelasse uma cor azul, o resultado do teste era considerado positivo; em caso de ficar amarelo, o resultado do teste era expresso como negativo (BIOCLIN,

2013). Um leite devidamente pasteurizado deve ter a enzima fosfatase destruída, mostrando-se negativo para tal prova (Figura 19).



FIGURA 19. Tubo com teste positivo e negativo para presença de fosfatase (Fonte: Arquivo pessoal).

### 3.4 PROVAS PARA DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE

A adição de substâncias estranhas à composição normal do leite está ligada a fraudes que podem ocorrer desde a fonte de produção até a fase de comercialização (TRONCO, 2008), geralmente associado a três finalidades básicas: aumentar o volume, mascarar a acidez ou conservar o leite, podendo ocorrer uma associação de fraudes (LIPOA, 2013).

A adição de água ou água e reconstituintes é a fraude mais frequente, realizada por produtores e também pela indústria com o objetivo de aumentar o volume de leite. No caso de produtores são mais facilmente detectáveis pois são realizadas de maneira mais grosseira e dificilmente não são detectadas por um equipamento sensível como o crioscópio. Porém quando cometida pela indústria esta fraude pode ser indetectável, uma vez que dispendo de equipamentos de análises, é possível produzir facilmente soluções dentro do padrão (LIPOA, 2013).

#### 3.4.1 Adição de reconstituintes

Os reconstituintes são substâncias acrescentadas ao leite com finalidade de recompor a densidade e a crioscopia (LIPOA, 2013). Com essas substâncias foram

aperfeiçoadas as técnicas de fraudes de aguagem, sendo as mais comumente empregadas: amido solúvel, sacarose, cloreto de sódio e urina (TRONCO, 2008).

#### 3.4.1.1 Pesquisa de amido

Este composto apresenta capacidade de reconstituir a densidade, mas praticamente não altera o IC, sendo o conflito entre uma análise de densidade normal ou até acima do normal e uma crioscopia próximo de 0°C típico de fraude por adição de água e amido (LIPOA, 2013). Facilmente confirmada com a prova de detecção de amido.

Técnica utilizada: transferia-se 10 mL de leite para o tubo de ensaio que era submetido ao aquecimento em banho-maria até ebulição. Após 5 min em ebulição, a amostra era esfriada em água corrente. Adicionava-se 2 gotas de solução de Lugol e observava a coloração produzida. Tubos que apresentava coloração azul era considerado positivo para presença de amido (LUTZ, 2005) (Figura 20).

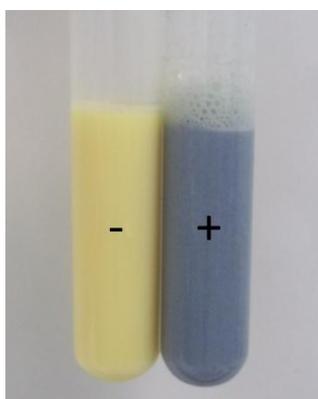


FIGURA 20. Tubo negativo e positivo para presença de amido (Fonte: Arquivo pessoal).

A detecção do amido ocorre pela ação do iodo sobre a  $\beta$ -amilose, fração solúvel do amido que absorve o iodo e forma um composto de cor azul. O aquecimento é feito com o objetivo de facilitar a abertura da cadeia de amido para que o iodo seja absorvido pela cadeia de  $\beta$ -amilose (TRONCO, 2008; LUTZ, 2005).

### 3.4.1.2 Pesquisa de sacarose

É um reconstituintes de densidade utilizado com grande frequência, isso porque seu sabor é mais aceitável, e se confunde melhor com o leite. O açúcar influencia tanto a densidade como a crioscopia (LIPOA, 2013).

Técnica utilizada: transferia-se 10 mL de leite para um tubo de ensaio, 1 mL de ácido clorídrico concentrado e 0,1g de resorcina. Posteriormente, agitava-se e submetia o tubo ao aquecimento em banho-maria por 5 min. Na presença de sacarose, o leite apresentava-se com coloração rósea imediata. Não era levado em consideração se a coloração aparecesse somente após algum tempo, uma vez que a reação também hidrolisa a lactose (LIPOA, 2013) (Figura 21).

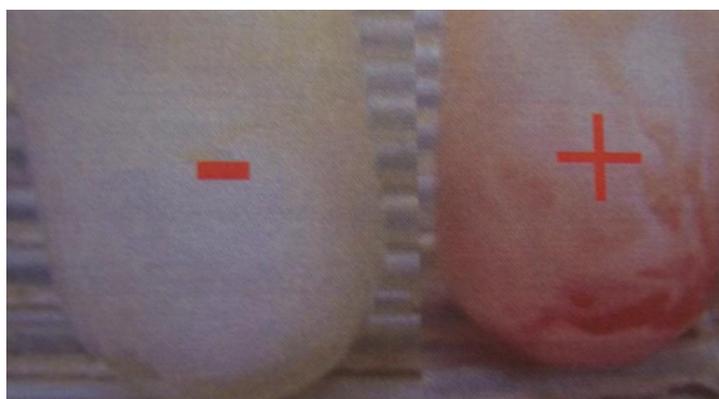


FIGURA 21. Amostra negativa e positiva para presença de sacarose (Fonte: Ronaldo Tamanini).

A detecção de sacarose ocorre devido a capacidade da resorcina condensar com as aldoses em meio ácido, proporcionado pela adição de ácido clorídrico, revelando assim a coloração rósea (TRONCO, 2008).

### 3.4.1.3 Pesquisa de cloreto de sódio

O cloreto de sódio é outro componente bastante utilizado para normalizar a densidade e o IC. No entanto, o sal influencia mais fortemente no sabor, sendo mais desagradável do que o açúcar (LIPOA, 2013).

Técnica utilizada: Em um tubo de ensaio depositava-se 10 mL de leite, seguida de adição de 0,5 mL de solução de cromato de potássio 5% e 4,5 mL de

solução de nitrato de prata 0,1N. A coloração amarela clara resultava em positivo para a presença de cloretos em quantidades superiores à faixa de normalidade (0,08 a 0,1%). Tubos com coloração amarelo "gema de ovo" eram considerados negativos (LIPOA, 2013) (Figura 22).

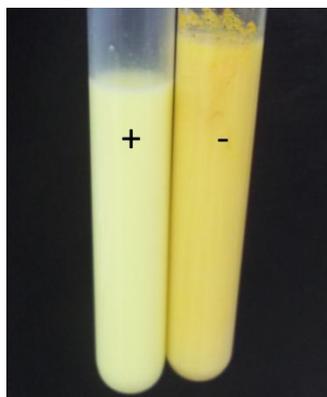


FIGURA 22. Tubo positivo e negativo para presença de cloreto de sódio acima da faixa de normalidade (Fonte: Arquivo pessoal).

A reação tem como princípio a utilização do nitrato de prata pelo cloreto. Quando o teor de cloretos no leite é normal, a quantidade de nitrato de prata adicionada é excessiva, reagindo, então, com o indicador (cromato de potássio) obtendo uma coloração amarelo "gema de ovo". Se o teor de cloretos estiver elevado, haverá maior consumo de nitrato de prata, diminuindo a intensidade da coloração amarela (TRONCO, 2008).

#### 3.4.1.4 Pesquisa de álcool etílico

O álcool tem a capacidade de aprofundar o IC tornando-o mais negativo, sendo 0,05% capaz de aprofundar cerca de 0,020<sup>o</sup>H. Geralmente, é adicionado com a finalidade de mascarar a fraude por adição de água (LIPOA, 2013).

Técnica utilizada: Em um kitasato, colocava-se 100 mL da amostra de leite e 10 mL de solução antiespumante (solução a 3%). Em um tubo de ensaio adicionava-se 2 mL de solução sulfocrômica e mergulhava nessa solução a extremidade da pipeta de Pasteur que estava acoplado ao kitassato por um tubo de silicone ou látex, de modo a formar um sistema fechado. O kitasato era aquecido e mantido sob fervura por 5 min (Figura 23).



FIGURA 23. Kitasato acoplado na pipeta de Pasteur (Fonte: Arquivo pessoal).

Esperava-se como resultado positivo a alteração da coloração da solução sulfocrômica normal para verde escuro. Em casos de tubos com coloração inalterada da solução, era considerado como negativo para presença de álcool (Figura 24).



FIGURA 24. Resultado negativo e positivo para presença de álcool etílico (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 3.4.2 Adição de conservantes

A adição de conservantes é realizada de maneira fraudulenta, com o intuito de aumentar a vida útil do produto (LIPOA, 2013). De acordo com o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA (1980), não

existe nenhuma situação que seja permitida a adição de substâncias conservadoras ao leite, isto porque poderia ocorrer falta de interesse pela limpeza, higiene e refrigeração durante a obtenção e posterior conservação do leite, além da ação prejudicial à saúde do consumidor e a certas aplicações tecnológicas do leite em natureza.

Os conservantes atuam como bactericidas ou bacteriostáticos, eliminando ou controlando o crescimento microbiano no leite. Os mais frequentemente utilizados são o peróxido de hidrogênio, o formol e o hipoclorito (LIPOA, 2013).

#### 3.4.2.1 Pesquisa de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

É um potente agente oxidante, capaz de comprometer o metabolismo microbiano a ponto de matar a célula ou impedir sua multiplicação. É o conservante mais próximo ao ideal, uma vez que os metabólitos resultantes da sua degradação, água e oxigênio, são inócuos.

Técnica utilizada: Transferia-se 10 mL da amostra de leite para o tubo de ensaio e submetia ao aquecimento em banho-maria a 65°C. Posteriormente, adicionava-se 2 mL da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1%. Na presença de  $H_2O_2$ , esperava-se o desenvolvimento de coloração salmão (Figura 25).

Na ausência desta coloração, adicionava-se 2 mL de leite cru, para confirmação da ausência de  $H_2O_2$ . Se após a adição de leite cru ocorresse a formação da coloração salmão, concluíam-se que o leite possui adição de  $H_2O_2$  e que havia sido superaquecido, ocorrendo a inativação da peroxidase (elemento fundamental para aplicação da técnica).

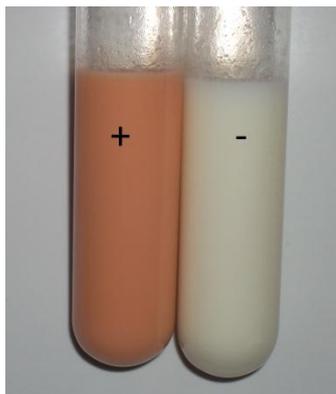


FIGURA 25. Resultado positivo e negativo na análise de  $H_2O_2$  (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 3.4.2.2 Pesquisa de formaldeído

Quando utilizado como desinfetante, é um excelente bactericida, fungicida e, elimina também esporos de bactérias. Quando adicionado ao leite, além de matar os micro-organismos, reage com a caseína e a albumina, formando compostos insolúveis (LIPOA, 2013).

O consumo de leite com presença de formol não é seguro para a saúde humana (ANVISA, 2013). O formol ou formaldeído é tóxico e é considerado cancerígeno pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) desde 2006. Devido a sua solubilidade em água, o formol é rapidamente absorvido no trato respiratório e gastrointestinal e metabolizado. Embora o formol ou metabólitos sejam capazes de penetrar na pele humana, a absorção dérmica é mais leve, porém pode induzir a dermatites de contato (ANVISA, 2013; VIEIRA et al., 2013).

Técnica utilizada: Em um balão de destilação colocava-se 100 mL de leite, 100 mL de água e 2 mL de ácido fosfórico. Essa solução era submetida a destilação até a obtenção de 50 mL de destilado. Posteriormente, pipetava-se em um tubo de ensaio 1 mL do destilado, 5 mL de solução de ácido cromotrópico a 0,5% em solução de ácido sulfúrico a 72%. Após 15 minutos de aquecimento em banho-maria, na presença de formol, observava-se uma coloração violácea (Figura 26).

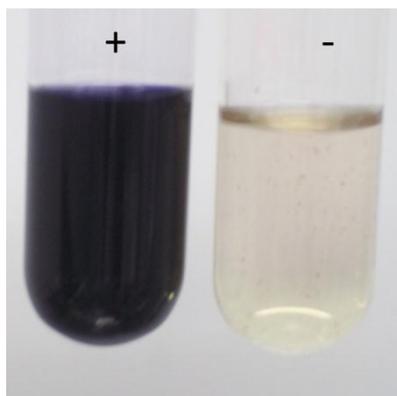


FIGURA 26. Resultado positivo e negativo na prova de detecção de formaldeído (Fonte: Arquivo pessoal).

O formaldeído aquecido com ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico, origina um produto de condensação que, oxidado posteriormente, transforma-se em um composto p-quinoidal de coloração violeta (LUTZ, 2005).

#### 3.4.2.3 Pesquisa de cloro e hipoclorito

Tais substâncias geralmente aparecem como resíduos de sanitizantes dos equipamentos de ordenha ou da indústria ou podem ser colocados propositalmente devido seu efeito bactericida (TRONCO, 2008). Em contato com matéria orgânica, pode gerar substâncias carcinogênicas como tri-halometanos (LIPOA, 2013).

Técnica utilizada: em tubo de ensaio, era transferido 5 mL da amostra e adicionado 0,5 mL de solução de iodeto de potássio a 7,5%. O aparecimento da coloração amarela indicava a presença de cloro livre. Para confirmação, era adicionado 1 mL de solução de amido a 1%. Deveria desenvolver coloração azul ou violeta. Não havendo mudança de coloração, era interpretado como ausência de cloro livre (LUTZ, 2005).

Nesse caso, seguia-se para próxima etapa, onde era adicionado 4 mL de ácido clorídrico e submetido ao aquecimento em banho-maria a 80°C por 10 min. Após resfriava o tubo em água corrente e observava-se a coloração do coagulado, que na presença de hipoclorito deveria ser amarela. Para confirmação, era adicionado 1 mL de solução de amido a 1%. Na presença de hipoclorito, a solução deveria desenvolver uma coloração azul ou violeta (LUTZ, 2005) (Figura 27).

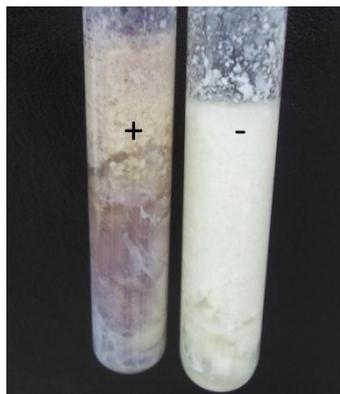


FIGURA 27. Resultado positivo e negativo para pesquisa de hipoclorito (Fonte: Arquivo pessoal).

A pesquisa tem como princípio a liberação do iodo a partir do iodeto de potássio na presença de cloro ou hipocloritos, que formam cloreto de potássio e liberam o iodo, que vão imprimir ao líquido uma coloração amarela. A coloração azul ou violeta é obtida quando adicionado a solução de amido solúvel se dá pela reação do amido com o iodo liberado (TRONCO, 2008).

### 3.4.3 Adição de neutralizantes de acidez

A acidez real do leite é composta pela combinação da acidez natural e da acidez adquirida (SILVA, 2013). O leite fresco é naturalmente ácido, apresentando pH entre 6,6 e 6,8 (TRONCO, 2008). Esta acidez, denominada de acidez natural do leite provém de sua própria constituição, ou seja, se deve à presença de caseína, fosfatos, citratos, albumina e dióxido de carbono (LIPOA, 2013).

Entretanto, quando o leite é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes ou é armazenado sob refrigeração inadequada ocorre a proliferação de bactérias mesófilas, cujas enzimas quebram a lactose, formando ácido lático e compostos secundários, resultando na denominada acidez adquirida do leite (PANCOTTO, 2011).

A adição de neutralizantes de acidez tem a finalidade de mascarar a acidez adquirida do leite cru, que é a principal causa de instabilidade da caseína implicando em problemas como sedimentação ou coagulação ao aquecimento (LIPOA, 2013), além de mascarar o estado higiênico-sanitário e sua forma de conservação nas

indústrias. As substâncias mais usadas são: bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, cal virgem e soda (TRONCO, 2008).

#### 3.4.3.1 Pesquisa de bicarbonato de sódio

Técnica utilizada: transferia-se 11 mL de leite da amostra para um béquer de 150 mL, com adição de 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Titulava-se com solução hidróxido de sódio 0,1N até coloração rósea persistente. Posteriormente, acidificava-se com 1 mL de solução de ácido sulfúrico 0,025 N, seguido de aquecimento até ebulição. Após resfriar rapidamente em banho de gelo, adicionava-se 2 mL de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (BRASIL, 2006). Como resultado positivo esperava-se uma coloração rósea, indicando a neutralização com bicarbonato de sódio (Figura 28).

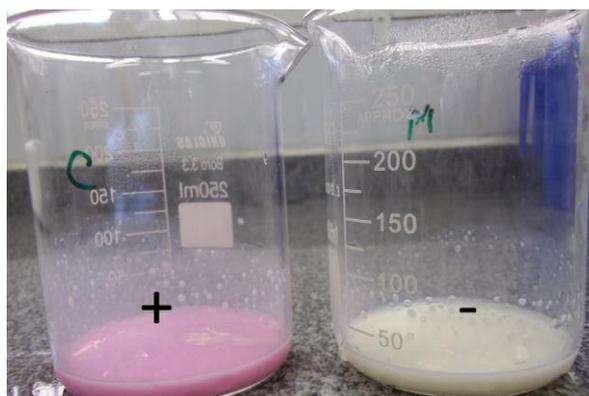


FIGURA 28. Resultado positivo e negativo para prova de neutralizantes de acidez (Fonte: Arquivo pessoal).

## **PARTE 2 - UNESP**

### **4. DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO**

No período compreendido entre 09 de setembro à 19 de novembro de 2013, com o total de 400 horas, parte do estágio supervisionado foi realizado no Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, tendo como orientador o Professor Doutor Germano Francisco Biondi que, além de ser o responsável pelo SOAP, é docente da disciplina de inspeção sanitária de produtos de origem animal.

A UNESP, criada em 1976, resultou da incorporação dos Institutos isolados de Ensino Superior do Estado de São Paulo, situadas em diferentes pontos do interior paulista. No centro-sul do Estado de São Paulo, na cidade de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, funciona a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. É uma instituição que se preocupa com o indivíduo e a sociedade, oferecendo através do ensino superior, oportunidade para formação intelectual e realização pessoal, formando profissionais competentes e habilitados para atuarem nas áreas Médica Veterinária e Zootécnica (UNESP, 2013).

O Curso de Graduação em Medicina Veterinária destacou-se por ter sido o primeiro curso do país, implantado com cinco anos de duração, caracterizando o último ano como estágio de treinamento profissional, abrangendo as áreas de conhecimento da Medicina Veterinária. O departamento conta com estrutura administrativa setores que incluem clínicas de pequenos e grandes animais, assim como os de radiologia, morfologia, patologia clínica, parasitologia, inspeção de produtos de origem animal, unidade de estudo e sanidade avícola, reprodução, fisiologia, imunologia, histopatologia e farmacologia (UNESP, 2013).

O SOAP desenvolve diversas atividades de ensino e pesquisa embora as atividades de extensão tenha aumentado nos últimos anos em virtude da grande procura pelas indústrias, cozinhas hospitalares, lanchonetes e hipermercados, para realização de análises para controle físico-químico e microbiológico de alimentos. Anualmente, são realizadas cerca de 29.000 análises dos mais diversos tipos de

alimentos para órgãos públicos e privados de todo o Estado de São Paulo (UNESP, 2013).

O SOAP, além dos professores responsáveis, Professor Doutor Germano Francisco Biondi e Professor Doutor José Paes de Almeida Nogueira Pinto, tem como integrantes dois técnicos de laboratório, responsáveis pelas análises microbiológicas e físico-químicas, duas funcionárias que preparam meios de cultura, reagentes, esterilizam material para as análises, esterilizam e lavam materiais de descarte dos laboratórios, dois funcionários responsáveis pelo recebimento das amostras, emissão dos laudos, arquivamento e secretariado em geral, quatro mestrandos, cinco doutorandos e quatro médicos veterinários residentes que atuam na rotina laboratorial.

#### 4.1 ÁREA FÍSICA

##### 4.1.1 Sala de reuniões e secretaria

A unidade conta com uma sala de reuniões e uma secretaria, dotadas de materiais essenciais para o funcionamento da rotina. Tal sala suporta a documentação das análises realizadas bem como os demais documentos burocráticos do laboratório (Figura 29).



FIGURA 29. Secretaria e sala de reuniões (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 4.1.2 Salas de apoio aos profissionais

No prédio encontram-se salas para cada professor atuante no laboratório, uma sala para os residentes e uma sala para os pós-graduandos (Figura 30).



FIGURA 30. (a) Sala dos residentes. (b) Sala dos pós-graduandos (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 4.1.3 Laboratório da pesquisa

Este laboratório é destinado para realização dos experimentos de alunos de mestrado e doutorado que estão vinculados ao Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (Figura 31).



FIGURA 31. Laboratório da pesquisa (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 4.1.4 Salas de preparo de meios, lavagem de material e autoclavação

Sala destinada ao preparo do material utilizado na rotina. É equipada com pia, micro-ondas, destilador de água, mesa, armário, duas autoclaves utilizadas para preparo de meios da rotina e da pesquisa, e várias estufas com diferentes temperaturas para secagem das vidrarias utilizadas na rotina (Figura 32).



FIGURA 32. Sala de preparo de meios, lavagem de material e autoclavação (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 4.1.5 Laboratório de microbiologia

Local onde são realizadas todas as análises microbiológicas, desde a pesagem das amostras até a obtenção dos resultados. É dotado de fluxo laminar, balança, várias estufas (com temperaturas variadas), três banho-maria, bicos de Bunsen nas bancadas, duas capelas assépticas, pias e mesa central (Figura 33).

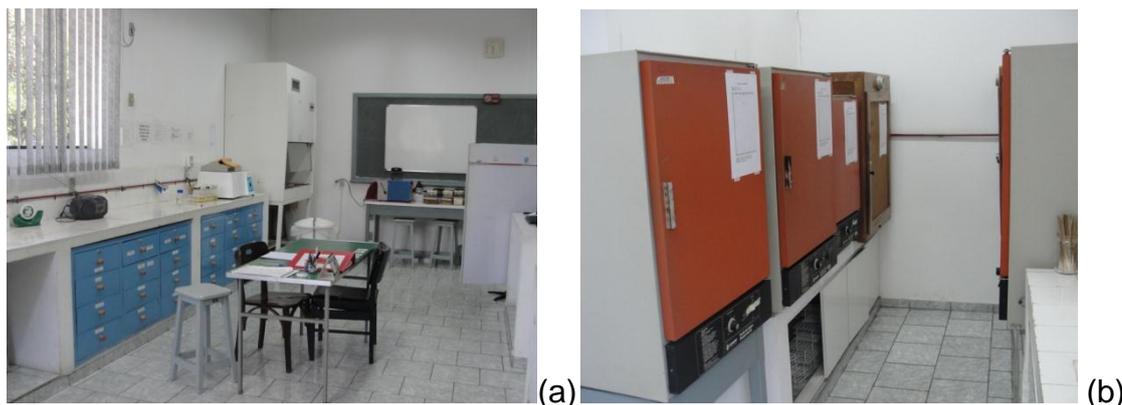


FIGURA 33. (a) Laboratório de microbiologia (b) Estufas com várias temperaturas para incubação das análises microbiológicas (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 4.1.6 Laboratório de análises físico-químicas

O laboratório possui uma bancada central, onde se encontra a maioria dos reagentes utilizados nas análises de rotina, dois exaustores, destilador de água, geladeira, mufla, estufa, centrífuga, banho-maria, refratômetro, espectrofotômetro, crioscópio eletrônico, refratômetro de Abbé, dessecadores, balança analítica, pHmetro, além de uma pia e um chuveiro de emergência (Figura 34).



FIGURA 34. Laboratório de análises físico-químicas (Fonte: SOAP).

#### 4.1.7 Sala de descarte de materiais contaminados

Esta sala é destinada para uso exclusivo de descarte de material contaminado utilizado na rotina microbiológica. Possui uma autoclave própria para o descarte, e duas pias para lavagem do material (Figura 35).



FIGURA 35. Sala de descarte de materiais contaminados (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 4.1.8 Almoxarifado

Local onde são estocados os materiais necessários para o andamento da rotina microbiológica e físico-química (Figura 36).



FIGURA 36. Almoxarifado (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 4.1.9 Sala da Unidade Técnica Regional de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

No mesmo prédio, encontra-se a Unidade Técnica Regional de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (UTRA), que tem como finalidade prestar atendimento técnico a pessoas jurídicas, autoridades e entidades públicas em assuntos como a fiscalização de abatedouros, matadouros frigoríficos, empresas produtoras de alimentos para animais, laboratórios veterinários, centrais de manipulação genética, cooperativas de frutas, laticínios, granjas avícolas e leiteiras, descentralizando,

assim, as ações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No entanto, esta unidade é um espaço cedido ao MAPA e sua administração é independente da estrutura administrativa do SOAP.

## 5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o estágio foram desenvolvidas diversas atividades da rotina laboratorial, na área microbiológica e físico-química, e acompanhamento de projetos de pesquisas que estavam sendo executados pelos alunos de mestrado e doutorado. Além do acompanhamento de visita técnica ao Matadouro-frigorífico de Bovinos Frigor, localizado na cidade de Lençóis Paulista, SP. Uma vez por semana havia reuniões para apresentação e discussão de artigos científicos.

### 5.1 RECEPÇÃO, COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS E CADASTRAMENTO

Diariamente eram coletadas no Hospital das Clínicas da UNESP amostras de leite, dietas entéricas e saladas que eram fornecidas aos pacientes internados no hospital. Uma vez por semana coletava-se água de dois ou três pontos diferentes do hospital para análise. Uma vez por mês, um residente era responsável por realizar a coleta de *swabs* de superfícies e mãos de funcionários do restaurante do Hospital Estadual de Bauru (HEB). Além destas amostras, eram recebidas no laboratório diversas amostras de saladas, cereais, carnes, sucos, água, leite e dietas entéricas provenientes de outros locais.

Todas as amostras que chegavam ao laboratório passavam pela recepção, onde eram cadastradas e recebiam um número de identificação. Então eram imediatamente armazenadas sob refrigeração até o início das análises.

#### 5.1.1 Método de coleta das amostras provenientes do Hospital das Clínicas da UNESP

O residente responsável pela rotina microbiológica seguia até o Serviço Técnico de Nutrição e Dietética (STND), e coletava as amostras, que eram

previamente preparadas e mantidas sob refrigeração, pelos funcionários do restaurante responsáveis pelo setor. As amostras eram acondicionada em caixa isotérmica e eram levadas para o laboratório, onde eram registradas e mantidas em geladeira até o momento da análise.

A coleta da água também era realizada pelo residente responsável pela rotina microbiológica. A determinação do ponto de coleta se dava através de um cronograma pré-elaborado, sendo que a cada semana a água era coletada em uma ala diferente do hospital. Utilizava-se para coleta, recipientes estéreis contendo 0,1 mL de tiosulfato de sódio 1%, responsável por neutralizar o cloro residual, próprios para a coleta de 100 mL de água tratada.

Antes da obtenção da amostra, realizava-se a assepsia da torneira. Em seguida, abria-se e desprezava-se a água que estava estagnada na tubulação, para então ser coletada (Figura 37). Posteriormente as amostras eram armazenadas em caixa isotérmica e levadas até o laboratório onde eram registradas e mantidas na geladeira até o início da análise.

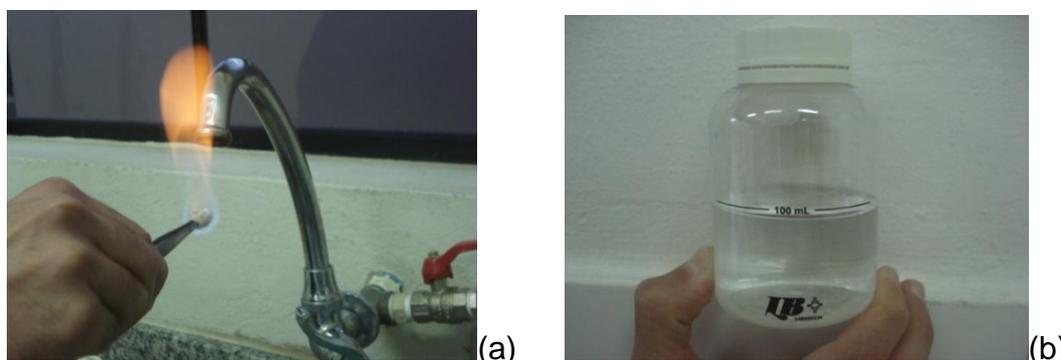


FIGURA 37. (a) Higienização e flambagem da torneira. (b) Recipiente contendo a água para análise (Fonte: Cibeli Viana).

#### 5.1.2 Método de coleta das amostras provenientes do Hospital Estadual de Bauru

Uma vez por mês, o residente responsável pela rotina microbiológica, ia até Bauru - SP para a realização de *swabs* e monitoramento microbiológico ambiental. O ponto de coleta era determinado previamente pelos responsáveis pelo restaurante do HEB.

Para a realização da coleta em superfícies planas (mesas, embalagens, paredes, etc), a embalagem que continha o *swab* estéril era aberta no momento da coleta, assepticamente, pelo lado da haste. A área a ser coletada era delimitada através de molde estéril, que também era aberto assepticamente, com dimensões de 10 cm x 10 cm (100 cm<sup>2</sup>). O *swab* era friccionado com pressão, rodando-o continuamente, para que toda superfície do algodão entrasse em contato com a amostra, no espaço delimitado pelo molde. Em seguida, o *swab* era transferido para tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Para a realização da coleta em superfícies irregulares, a área de coleta era delimitada utilizando o próprio equipamento (sem medir a área com molde).

Para a realização da coleta em mãos, a embalagem que continha o *swab* estéril era aberta no momento da coleta, assepticamente, pelo lado da haste e friccionado na região palmar, entre os dedos e no dorso. Em seguida, o *swab* também era transferido para tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina peptonada a 0,1%.

O *swab* não devia ser segurado próximo do algodão e a parte manuseada da haste devia ser quebrada na borda do tubo de ensaio, para não ter contato com o material amostrado.

Para a realização do monitoramento microbiológico ambiental, era utilizado a metodologia de sedimentação simples, que consistia na exposição de placas de Petri contendo ágar PCA, em locais pré-estabelecidos, por um período de tempo determinado (aproximadamente 15 min). As placas eram abertas e depositadas nos locais desejados, sem inverter. Após o período de exposição, tampava-se a placa, tomando os cuidados necessários para evitar contaminação.

Todas as amostras eram armazenadas em caixa isotérmica e levadas até o laboratório onde eram registradas e mantidas na geladeira até o início da análise.

## 5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS

Durante o estágio, foram realizadas análises microbiológicas de diferentes amostras: água, dietas e leites hospitalares, saladas cruas, leites pasteurizados, carne, leite materno e *swabs*.

### 5.2.1 Procedimento para pesagem

A etapa de pesagem era realizada com produtos sólidos ou pastosos. Era executada obrigatoriamente em fluxo laminar, após desinfecção superficial por radiação de luz ultra-violeta por 15 min. Antes da abertura da amostra era realizada assepsia da embalagem usando algodão embebido com álcool 70%. Com auxílio de pinças e facas, era cortado e pesado, assepticamente,  $25 \pm 0,2$  g da amostra, colhida de vários pontos do produto seguido de uma homogeneização 120 segundos em "stomacher". A cada amostra pesada utilizava-se um instrumental exclusivo para esta, devendo ao final da pesagem estes serem destinados ao setor de lavagem.

### 5.2.2 Procedimentos para diluição de amostras

Para produtos líquidos, a diluição de  $10^{-1}$  era obtida transferindo-se 1 mL da amostra para um tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% e homogeneizando-se a mistura em agitadores de tubos tipo "vortex". A partir  $10^{-1}$  preparava-se as diluições necessárias (BRASIL, 2003).

Para produtos sólidos ou pastosos, a diluição de  $10^{-1}$  era obtida transferindo-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1% para sacos plásticos para "stomacher" contendo  $25 \pm 0,2$  g da amostra. Após a homogeneização, era preparada as demais diluições, transferindo-se 1 mL da diluição para um tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% (BRASIL, 2003).

### 5.2.3 Análises de rotina

Eram realizadas análises para quantificação de mesófilos, de *Staphylococcus* coagulase positiva, de *Clostridium* sulfito redutor, de *Bacillus cereus*, de coliformes a 35°C e 45°C pelo método do NMP e determinação de presença/ausência de *Salmonella* sp.

As análises de coliformes a 35°C e 45°C era idêntica a realizada no LIPOA (parte 1), entretanto na análise de *Salmonella* sp. utilizava-se como meio de enriquecimento seletivo o RV e o Tetracionato (TT) e para o plaqueamento seletivo diferencial utilizava-se o XLD e o ágar Bismuto Sulfito (BS), e a análise de mesófilos

era feita utilizando petrifilm™ AC, através da inoculação de 1 mL de cada diluição e incubação a 35-37°C/48h. Transcorrido o tempo de incubação, fazia-se a contagem do número de colônias. Para leitura era utilizado mais de uma diluição, que continham entre 25 e 250 colônias (3M, 2013). Multiplicando o número de colônias contadas pelo inverso da diluição, tinham-se os resultados que eram expressos em UFC/g ou mL (BRASIL, 2003).

#### 5.2.3.1 Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva*

Os *Staphylococcus* sp. são cocos gram e catalase positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados (SANTOS et al., 2007), pertencentes à família Staphylococcacea e por se dividirem em mais de um plano, formam aglomerados de células que lembram um cacho de uva (SILVA et al., 2007; FRANCO & LANDGRAF, 2002). É capaz de sobreviver por longos períodos em objetos secos inanimados (fômites) e resiste a altas concentrações salinas e lipídicas (SOAP, 2009).

As espécies de estafilococos são hospedeiro-adaptadas, e metade das espécies conhecidas habitam somente em humanos ou humanos e outros animais. Um maior número tende a ser encontrado próximo as aberturas do corpo e superfície da pele, como por exemplo, nas narinas, axilas e na área da virilha. As duas fontes mais importantes de contaminação para alimentos são fossas nasais e mãos e braços de manipuladores de alimentos com feridas (JAY, 2005).

São bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C. A produção de toxinas ocorre numa faixa mais limitada de temperatura, entre 10°C e 46°C (FRANCO & LANDGRAF, 2002). O *Staphylococcus* sp. não é resistente ao calor, sendo facilmente inviabilizado na pasteurização ou na cocção de alimentos. As toxinas, ao contrário, são altamente resistentes, suportando tratamentos térmicos tão severos como a esterilização de alimentos de baixa acidez (SILVA et al., 2007).

Os sintomas da intoxicação estafilocócica aparecem geralmente dentro de quatro horas após a ingestão dos alimentos contaminados, embora intervalos entre 30 min a 8h tenham sido relatados. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, câibras abdominais geralmente bem dolorosas, diarréia e sudorese. Pode ocorrer

ainda dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial. O quadro clínico geralmente tem duração de 24 a 48h, e a taxa de mortalidade é bastante baixa, sendo mais restrita em indivíduos debilitados (FRANCO & LANDGRAF, 2002; JAY, 2005).

Os alimentos mais relatados em surtos incluem carnes e produtos cárneos (principalmente presuntos), produtos lácteos e derivados (principalmente queijos), aves, ovos, saladas mistas (com ingredientes como ovo, atum, frango, batata), macarrão, patês, molhos, tortas de cremes, bombas de chocolate e sanduíches com recheios. São de maior risco os alimentos muito manipulados durante o preparo e os que permanecem à temperatura ambiente depois do seu preparo (SILVA et al., 2007).

#### 5.2.3.1.1 Método de análise

A contagem de *Staphylococcus* sp. em alimentos pode ser feita com três objetivos diferentes: confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, verificar se o alimento é uma fonte potencial de *S. aureus*, ou indicar a contaminação pós-processo (que geralmente se deve ao contato com manipuladores ou com superfícies inadequadamente sanitizadas) (SILVIA et al., 2007).

A partir das diluições escolhidas, utilizava-se a técnica de semeadura superficial (*spread plate*) para realização da contagem, aplicando-se, para isso, 0,1 mL do inóculo com auxílio de uma alça de Drigalsky em ágar *Baird-Parker* (BP) previamente preparado em placa de Petri estéril. Após 48 horas de incubação em temperatura de 35°C, as placas que continham entre 20 e 200 colônias eram contadas (BRASIL, 2003).

No ágar BP sua composição evidencia a habilidade desse micro-organismo crescer na presença de 0,01 a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2 a 0,5% de cloreto de lítio e 0,12 a 1,26% de glicina. O *Staphylococcus aureus* reduz o telurito de potássio, produzindo colônias negras. Quando suplementado com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia, respectivamente (BRASIL, 2003).

Assim, colônias típicas apresentavam-se circulares, pretas, convexas com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e um halo transparente claro. As colônias atípicas eram negras ou acinzentadas não apresentavam halos ou apenas apresentavam um halo (BRASIL, 2003). Se a placa apresentasse colônias suspeitas de mais de um tipo, era contado cada tipo separadamente e anotado o resultado (SILVA et al., 2007).

Após a enumeração, era realizado a prova da coagulase para confirmação do resultado. O teste é baseado na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo micro-organismo.

Para realização do teste, eram selecionadas 3 colônias típicas e 3 atípicas e transferidas para tubos contendo 3mL de caldo *brain heart infusion* (BHI) para a confirmação do resultado. Decorrida a incubação a 35-27°C por 24 horas, transferia-se 0,3 mL do caldo BHI contendo o cultivo jovem em tubos contendo 0,3 mL de plasma de coelho liofilizado. Estes tubos seguiam para a estufa a 35°C onde permaneciam 24 horas, sendo que, durante as 6 primeiras horas, a leitura era feita de meia em meia hora para a observação da formação do coágulo (Figura 38). A contagem final era feita de acordo com o resultado do teste da coagulase e expresso em UFC/g ou mL (BRASIL, 2003).

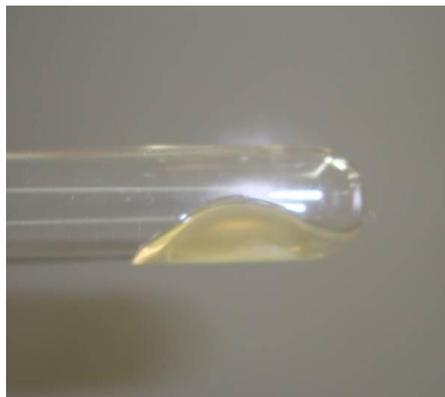


FIGURA 38. Prova da coagulase positiva (Fonte: Cibeli Viana).

#### 5.2.3.2 Contagem de *Clostridium* sulfito redutor e *Clostridium perfringens*

São cepas gram positivas na forma de bastonetes, anaeróbias estritas e imóveis. São esporogênicas, sulfito redutoras, fermentam a lactose, reduzem o nitrato e hidrolisam caseína e gelatina. O pH ótimo de crescimento é 7,2 e atividade

de água mínima de 0,93. São mesófilos, crescem ativamente em altas temperaturas, com máximo de 50°C, porém em baixas temperaturas as células vegetativas são muito sensíveis, morrendo rapidamente entre 0°C e 10°C. São também relativamente sensíveis ao NaCl (cloreto de sódio), crescendo bem em concentrações de até 2% mas não em 6,5% (SILVA et al., 2007).

Existem cinco tipos de *C. perfringens*, os quais são divididos de acordo com a presença de exotoxinas. Os tipos A, C e D são patógenos humanos, enquanto os animais são susceptíveis aos tipos B e E e, possivelmente, ao tipo A. A diarreia aguda causada por essa bactéria deve-se a produção de  $\alpha$ -toxina (FORSYTHE, 2002), formada a partir da passagem do micro-organismo pelo ambiente ácido do estômago, o qual atua como um fator de “stress” desencadeando a esporulação (SOAP, 2009).

*C. perfringens* é responsável por dois tipos diferentes de toxinfecção alimentar. Cepas do tipo A causam a intoxicação na forma clássica (caracterizada por dores abdominais agudas, diarreia com náuseas e febre, sendo vômitos raros, a partir 8 a 12h após ingestão de alimentos contendo número elevado de células -  $10^6$  a  $10^7$ /g de alimento), e cepas do tipo C, causam a toxinfecção necrótica, que é rara (caracterizada por dores abdominais agudas muito intensas, diarreia sanguinolenta, algumas vezes vômitos, e inflamação necrótica do intestino delgado, sendo frequentemente fatal) (FRANCO & LANDGRAF, 2002; CARVALHO, 2010).

As linhagens enterotoxigênica de *C. perfringens* encontram-se no solo, na água, em alimentos, na poeira, em especiarias e no trato intestinal do homem e de outros animais. São transmitidos para as carnes diretamente pelo abate ou pela contaminação posterior por utensílios, manipuladores ou poeira. Os alimentos envolvidos nos surtos são frequentemente pratos a base de carne, preparados em um dia e consumidos no dia seguinte, podendo dever-se, em parte, à lenta taxa de resfriamento desses alimentos e a alta incidência dessas linhagens em carnes (JAY, 2005).

#### 5.2.3.2.1 Método de análise

É realizado a contagem de *Clostridium* sulfito redutor através da inoculação da amostra ou diluição da mesma em meios de cultura seletivos contendo cicloserina ou polimixina B ou kanamicina e bisulfito de sódio. Sua aplicação na análise de alimentos é oferecer uma indicação simples e rápida da potencial presença de *C. perfringens*, que também é sulfito redutor (SILVA et al., 2007).

A partir das diluições escolhidas, semeava-se alíquotas de 1 mL, em placas estéreis e adicionava-se cerca de 15 mL de ágar SFP (Shahidi-Ferguson Perfringens) resfriado a 46 - 48°C. Deixava-se solidificar em superfície plana, para posteriormente adicionar uma segunda camada de cerca de 10 mL do mesmo meio. Imediatamente após a solidificação do ágar, incubava-se as placas em jarra de anaerobiose a 36°C ± 1°C, por 18 a 24 horas.

As colônias típicas de clostrídios sulfito redutores são negras (consequentes à redução de sulfito a sulfeto, que reage com citrato de amônia e ferro III, formando um precipitado negro) e de tamanho variável de 1 a 3 mm no SFP. Após incubação, realizava-se a contagem e multiplicando o número de colônias contadas pelo inverso da diluição, tinham-se os resultados que eram expressos em UFC/g ou mL (BRASIL, 2003).

#### 5.2.3.3 Contagem de *Bacillus cereus*

São bacilos gram positivos, aeróbios, mesófilos, com flagelos peritríquios e produtor de esporos. São capazes de utilizar vários carboidratos, todas as cepas são produtoras de hemolisinas, multiplicam-se bem entre 19°C e 48°C (com ótimo crescimento entre 28°C e 35°C), apresentam atividade de água mínima de 0,95, crescimento reduzido a 7,5% de NaCl e pH ideal entre 4,9 a 9,3 (CARVALHO, 2010). São produtores de várias enterotoxina, produzida na fase logarítmica com dose mínima infectante de 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> UFC/g.

É amplamente distribuído na natureza, tendo o solo como seu reservatório natural. Dentre os vegetais, o arroz tem sido o alimento mais envolvido em surtos causados por *Bacillus cereus*. É também encontrado em superfícies de carnes bovina, suína e de frangos, certamente devido à contaminação com o solo. É um

problema sério também em laticínios sendo que seus esporos são comumente encontrados em leite em pó (FRANCO & LANDGRAF, 2002). A presença de *B. cereus* em alimentos não representa risco à saúde, a menos que possa se multiplicar e atingir populações maiores do que  $10^5$  células viáveis por grama. O cozimento ativa os esporos e, se a refrigeração não for adequada, esses esporos podem germinar e produzir as toxinas (SILVA et al., 2007).

São conhecidas dois tipos de doenças provocadas por *B. cereus* resultantes da ingestão de toxinas formadas no alimento. Uma é a síndrome diarréica, caracterizada por dores abdominais e diarréia, com período de incubação de 8 a 16h e sintomas entre 12 e 24h. É provocada pela toxina diarréica, uma proteína termossensível, inativada por aquecimento a  $56^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ . A outra é a síndrome emética caracterizada por náusea e vômito, entre 1 e 5 h depois do consumo do alimento contaminado. A diarréia não é o sintoma predominante nesse caso, mas pode ocorrer. É provocada pela toxina emética, um pequeno peptídeo altamente resistente ao calor, que pode suportar o cozimento e, também, tratamentos térmicos muito mais severos, como  $126^{\circ}\text{C}$  por 90 min ou  $120^{\circ}\text{C}$  por mais de uma hora. A temperatura ótima para a produção da toxina emética em arroz é de  $25\text{-}30^{\circ}\text{C}$  (SILVIA et al., 2007).

#### 5.2.3.3.1 Método de análises

A partir das diluições desejadas, inoculava-se 0,1 mL da amostra, pelo método do plaqueamento em superfície, em placa de Petri estéril contendo ágar *B. cereus* que era incubado a uma temperatura de  $30^{\circ}\text{C}/48$  h, procedendo a leitura através das características morfológicas das colônias. Não foi possível observar as características morfológicas das colônias, pois nenhuma das amostras analisadas durante o período de estágio foi positiva.

#### 5.2.3.4 Análise de água

A água coletada no Hospital das Clínicas era submetida à análise de mesófilo, através do método com Petrifim<sup>TM</sup> AC, e à análise de coliformes a  $35^{\circ}\text{C}$  e  $45^{\circ}\text{C}$  pelo método do NMP com algumas alterações no teste presuntivo, onde fazia-se

inoculação de 10 mL da água em uma série de 3 tubos com 10 mL de caldo LST em dupla concentração, 1 mL da água na segunda série de 3 tubos de LST concentração simples e 1 mL da diluição  $10^{-1}$  na terceira série de 3 tubos de LST concentração simples. Após a incubação por 48 h em 35°C era realizada a leitura e os tubos com formação de gás, eram considerados positivos indicando a presença presuntiva de coliformes. E, então, era feita a prova confirmativa igualmente ao descrito na Parte 1 (BRASIL, 2003).

### 5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS

Durante o estágio, foram realizadas análises físico-químicas de diferentes amostras: carnes, água, gelo, mel, leites hospitalares, leite materno, cereais e farinha de víceras.

#### 5.3.1 Análises físico-químicas de produtos cárneos

##### 5.3.1.1 Características sensoriais

O exame sensorial da aparência, textura e odor é de grande importância, pois são essas características as que mais se alteram no início da deterioração das carnes.

Aparência: Própria de cada espécie, uniforme, sem acúmulo sanguíneo, sem corpos estranhos e sem presença de limo na superfície. A gordura deve ser de uma tonalidade que varia de branca a amarela e não deve apresentar pontos hemorrágicos. A cor das carnes deve ser uniforme, sem manchas escuras ou claras, variando na espécie bovina do vermelho-escuro ou pardacento ao vermelho-cereja ou claro; na espécie suína, a superfície de corte deverá apresentar-se com uma aparência marmórea, sem flacidez e não exsudativa. Nas aves o tom varia de amarelo-avermelhado ao amarelo-esbranquiçado (LUTZ, 2005).

Textura: A textura da carne normalmente é firme, compacta, elástica e ligeiramente úmida. A gordura deve mostrar-se firme ao tato. No início da putrefação, a superfície torna-se viscosa ou limosa e a carne perde firmeza (LUTZ, 2005).

Odor: As carnes frescas devem apresentar um odor suave, agradável e característico de cada espécie, tornando-se amoniacal, sulfídrico e depois pútrido, quando em estado de deterioração. A gordura também deve ter odor suave e característico, sendo indicativos de alteração os odores modificados ou o odor de ranço (LUTZ, 2005).

#### 5.3.1.2 Aferição do pH

O pH da carne é um importante parâmetro de qualidade já que pode influenciar a cor, a capacidade de retenção de água, a maciez, suculência e estabilidade microbiológica (STEPHENS, 2006).

O pH muscular logo após o abate é de aproximadamente 7,0. Com a sangria, cessa o suprimento de oxigênio no músculo, que passa utilizar como fonte de energia o glicogênio através da via glicolítica anaeróbica, tendo como produto final ATP (adenosina trifosfato) e ácido lático. Na ausência de circulação, o ácido lático não pode ser levado até o fígado para ser metabolizado e se acumula no tecido muscular provocando a queda do pH. O valor do pH, após 24 horas do abate (pH final), deve estar em torno de 5,8 a 5,5. Quando o pH atinge esses valores ocorre à inibição enzimática e a glicólise anaeróbica paralisa (STEPHENS, 2006; CAROLINO, 2009).

Técnica utilizada: O pH era aferido utilizando o pHmetro específico para análise de carne, através da introdução do eletrodo no seu interior (Figura 39).



FIGURA 39. Aferição do pH da carne através do pHmetro (Fonte:Arquivo pessoal).

Carnes bovinas, suínas e de aves com pH entre 5,8 a 6,2 era consideradas carne boa para consumo. Quando o pH encontrava-se com 6,4 era indicado apenas para consumo imediato (limite crítico para consumo). As carnes com pH acima de 6,4 (início de decomposição - imprópria para consumo) era imediatamente submetido a testes complementares (Prova de H<sub>2</sub>S e Prova de Éber). Para pescado o limite aceitável do pH era de 6,0 a 6,8.

#### 5.3.1.3 Prova de H<sub>2</sub>S - Reação para gás sulfídrico

O estudo da conservação de produtos cárneos pode ser avaliado por meio dessa reação, onde se constata a presença de H<sub>2</sub>S, proveniente da decomposição bacteriana dos aminoácidos sulfurados da carne liberando enxofre (normalmente liberados em estágios de decomposição mais avançados), o qual em meio ácido transforma-se em H<sub>2</sub>S (LUTZ, 2005).

Técnica utilizada: transferia-se 10g da amostra homogeneizada e 20 mL de água destilada para um erlenmeyer de 250 mL. Cobria-se o erlenmeyer com um papel filtro, onde pingava-se 1-2 gotas de solução de acetato de chumbo 5%. Com outro papel filtro, tampava-se novamente o erlenmeyer com fita. Posteriormente, colocava-se o frasco dentro de um béquer com água e aquecia em bico de bunsen por 10 minutos, após o início da fervura. Na presença de H<sub>2</sub>S notava-se o aparecimento de uma mancha enegrecida tipo grafite (Figura 40).

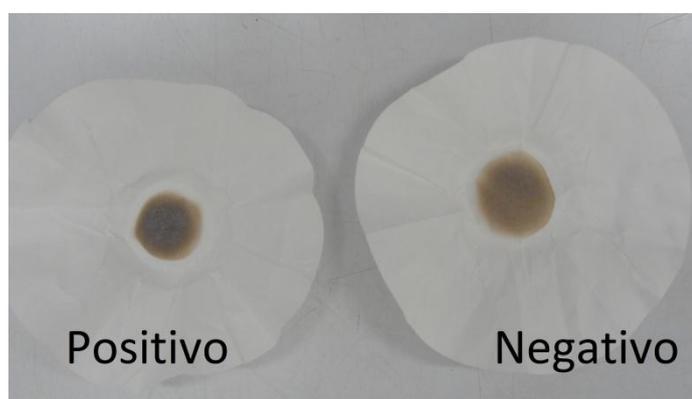


FIGURA 40. Resultado positivo e negativo para prova H<sub>2</sub>S (Fonte: Arquivo pessoal).

A prova fundamenta-se na combinação do  $H_2S$  com a solução de acetato de chumbo, produzindo sulfeto de chumbo, revelado através do enegrecimento do papel filtro previamente tratado com a referida solução-reagente (LUTZ, 2005).

#### 5.3.1.4 Prova de Éber - Reação para amônia

O estado de conservação de alimentos protéicos também é avaliado por meio da reação de Éber. A liberação de amônia indica o início da degradação das proteínas.

Técnica utilizada: Preparava-se o reagente de Éber no momento do uso, em um balão volumétrico de 250 mL, misturando 50 mL de ácido clorídrico e 150 mL de álcool. Posteriormente, completava o volume com éter. Pipetava-se 5 mL desse reagente em um tubo de ensaio de 25 mL. Fixava-se um pedaço da amostra na extremidade de um gancho de arame e introduzia no tubo de modo que não tocasse nem nas paredes do tubo nem na superfície do reagente (Figura 41). O aparecimento de fumaças brancas e espessas indicava que o produto estava em início de decomposição.

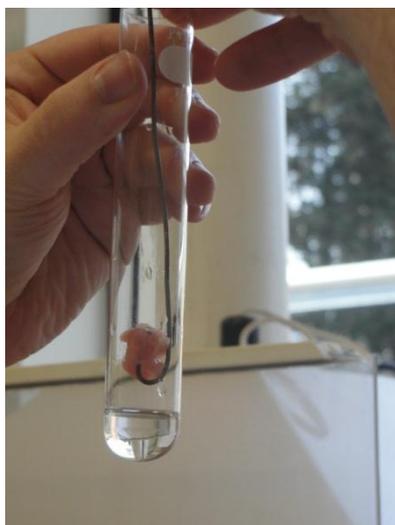


FIGURA 41. Realização da prova de Éber (Fonte: Arquivo pessoal).

Esta prova pesquisa gás amônio ( $NH_3$ ) decorrente da putrefação da carne, que na decomposição os grupamentos aminas são quebrados e formam  $NH_3$  gasoso

que se combina com o cloro (carreado pelo éter que é volátil), formando assim  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (cloreto de amônio) que é a fumaça esbranquiçada (SOAP, 2009).

#### 5.3.1.5 Quantificação de lipídios pela técnica do Butirômetro

Técnica utilizada: Pesava-se 0,5 g da amostra homogeneizada (anotava-se o peso para aplicação na fórmula) em um béquer de 50 mL, adicionava-se 10 mL de ácido sulfúrico. Homogeneizava a mistura com bastão de vidro de tal forma que não sobrasse resíduos de carne. Passava-se cuidadosamente para butirômetro de leite com auxílio de bastão de vidro, sem perda da amostra. Posteriormente, lavava-se 3 vezes o béquer com 3 mL de ácido sulfúrico. Adicionava-se 1 mL de álcool isoamílico. Colocava-se o butirômetro no banho-maria a 65 °C por 10-15 minutos. E então era centrifugado durante 5 minutos na centrífuga de Gerber. Fazia-se a leitura e calculava-se a porcentagem de gordura através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ lipídios} = \frac{\text{leitura no butirômetro} \times 11,33}{\text{Peso}}$$

Onde: peso = massa da amostra em gramas; 11,33 = massa em gramas do leite, se utilizarmos o método de Rose Gottlieb:  $d = m/v$ ; densidade média do leite = 1,030;  $V$  = volume da amostra (11 mL);  $m = d \times V = 1,030 \times 11 = 11,33$  g.

#### 5.3.2 Análises físico-químicas do leite materno

O banco de leite materno do Hospital das clínicas do Campus da Universidade Estadual Paulista enviava semanalmente amostras de leite materno ordenhado de doadoras.

O banco de leite segue o programa regulamentado pela RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006 (ANVISA, 2006), que tem por objetivo estabelecer os requisitos para instalação e funcionamento de banco de leite humano e posto de coleta de leite humano em todo território nacional, visando garantir a segurança sanitária do leite humano ordenhado.

### 5.3.2.1 Prova da acidez

A acidez do leite determina se poderá ou não ser utilizado para amamentação de neonatos. Acidez progressiva desestabiliza as micelas de caseína, liberando fósforo e cálcio que unem as frações das micelas levando a uma indisponibilidade do cálcio, causando assim possíveis prejuízos nutricionais, além de promover a coagulação, aumentar a osmolaridade, alterar o flavor (sabor e odor) e reduzir as propriedades imunobiológicas do leite. Algumas bactérias utilizam os carboidratos do leite como fonte de energia produzindo, assim, ácido láctico (SILVA, 2008).

Técnica utilizada: Em copo plástico de 50 mL colocava-se 8 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 2 mL do leite materno e 3 gotas de fenolftaleína. Titulava-se com solução Dornic (NaOH N/9) com auxílio da bureta. Cada gota de dornic corresponde a 2,5 °D, valores superiores a 8 °D desqualificava o produto para consumo (Figura 42).



FIGURA 42. Análise de acidez do leite materno (Fonte: Arquivo pessoal).

### 5.3.2.2 Crematócrito do leite materno

Consiste em centrifugar amostras de leite, para aferir a quantidade de gordura existente e, por meio de cálculos matemáticos específicos, determinar o conteúdo energético (ANVISA, 2006).

Técnica utilizada: o leite era aquecido em banho-maria 40°C por 10 minutos, para posteriormente ser colocado em capilares, seguido de centrifugação por 15 minutos e leitura em milímetro (com régua) da porção total e da porção de creme (Figura 43). Então utilizava-se uma tabela para interpretação dos resultados. A RDC

determina como dentro do aceitável leites com no mínimo 250Kcal/L (ANVISA, 2006).

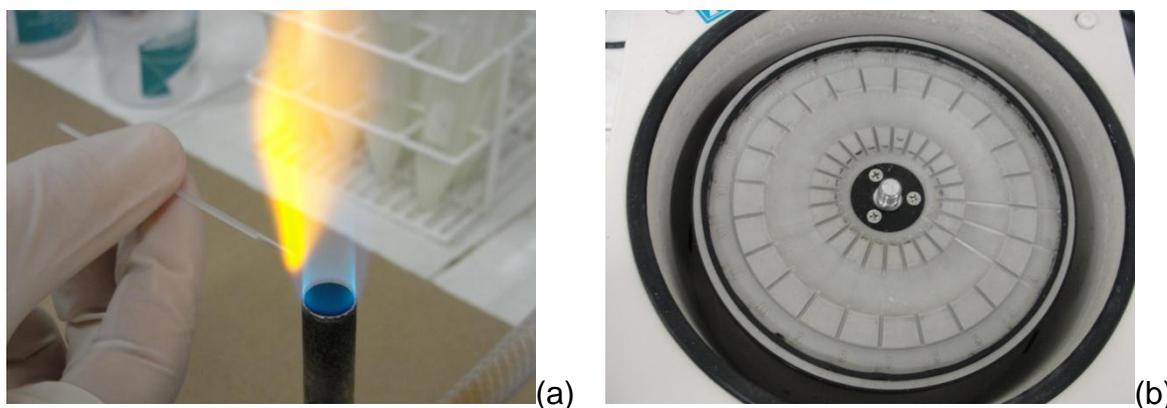


FIGURA 43. Análise do crematócrito do leite materno. (a) O capilar era fechado em uma das pontas utilizando o fogo. (b) Centrífuga utilizada na prova (Fonte: Arquivo pessoal).

### 5.3.3 Análise físico-química dos leites hospitalares

Além das análises microbiológicas, os leites, coletados no STND pelo residente responsável, também era submetidos à análise de acidez.

#### 5.3.3.1 Determinação da acidez pelo método Dornic (prova quantitativa)

A solução Dornic é um álcali (Hidróxido de Sódio N/9) que, adicionado a uma amostra de leite, provoca a neutralização de sua porção ácida (SOAP, 2009). Para visualização do ponto onde esta neutralização acontece, utiliza-se um indicador, a solução alcoólica de fenolftaleína a 1 % (TRONCO, 2008).

Sendo assim, a titulação com a solução de Dornic mede a capacidade tamponante da amostra de leite, sendo que o ponto de viragem do indicador dá-se em pH 8,3. Cabe ressaltar que este ponto de viragem, e conseqüentemente o valor da acidez da amostra, vai depender, em última análise, da concentração de sólidos totais do produto, especialmente de proteína e sais minerais, bem como do teor de CO<sub>2</sub> dissolvido; a quantidade de indicador adicionado à amostra também influencia,

não devendo ser superior ao indicado na técnica analítica. Tendo ocorrido fermentação do produto, a acidez será mais alta (BRASIL, 2003; LUTZ, 2005).

Técnica utilizada: Colocava-se com pipeta volumétrica 10 mL de leite previamente homogeneizados em um béquer onde adicionava-se 3 a 5 gotas de fenolftaleína para então gotejar, com o auxílio de um acidimêtro a solução Dornic, sempre em constante agitação da amostra, até o ponto de viragem que é levemente róseo. Anotava-se o volume de solução gasto.

0,1 mL de solução Dornic (1°D) = 0,01 g de ácido láctico / 100 ml de leite

Segundo a legislação brasileira, a acidez do leite fresco pode variar de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico / 100 mL de leite (correspondente a 14 a 18 °D). Porém, os leites hospitalares são leites com formulações distintas, preparados com finalidade de suprir as necessidades dos pacientes internados no hospital, havendo, assim, uma padrão de acidez diferente para cada formulação.

#### 5.3.4 Análises físico-químicas do mel

Cada amostra era submetida às análises físico-químicas de acidez, “Fiehe”, determinação quantitativa de HMF (hidroximetilfurfural), “Lund”, determinação da atividade diastásica, umidade e determinação de pH, de acordo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

##### 5.3.4.1 Determinação de Acidez

A origem da acidez no mel deve-se à variação dos ácidos orgânicos, causada pelas diferentes fontes de néctar; pela ação da enzima glicose-oxidase sobre a glicose que origina o ácido glucônico (MENDES, 2009); pela ação das bactérias durante a maturação do mel; e ainda pela quantidade de minerais presentes no mel. Desta forma, a acidez do mel é um componente de extrema relevância, pois além de conferir características químicas e sensoriais, contribui para a sua estabilidade frente ao desenvolvimento de micro-organismos (FINCO, 2010).

Técnica utilizada: pesava-se em um béquer de 250 mL, 10 gramas de mel e adicionar 100 mL de água destilada. Posicionava o béquer em cima do agitador

com um imã dentro. O eletrodo do pHmetro também devia estar inserido na solução. Com uma bureta de 10mL com NaOH 0,1N, pingava-se vagarosamente até que a solução de mel atinja pH de 8,3. O resultado era obtido através do ajuste com a fórmula:

$$\text{Acidez} = V_{\text{base}} \times F_{\text{cbase}} \times \text{peso da amostra (Meq/Kg)}$$

Onde:  $V_{\text{base}}$  = Volume de NaOH utilizado para atingir o pH de 8,3;  $F_{\text{cbase}}$  = Fator de correção do NaOH.

Segundo a IN 11, determina-se o máximo permitido de 50 mil equivalentes por quilograma (meq/kg) (BRASIL, 2000).

#### 5.3.4.2 Reação de Fiehe (Análise qualitativa de HMF)

O HMF é um composto naturalmente presente no mel que surge em consequência da degradação das hexoses. Quando presente em grande quantidade pode significar um produto armazenado por um longo período, ou um produto que sofreu um superaquecimento durante sua manipulação ou ainda pode se tratar de um produto fraudado por adição de xarope de glicose ou açúcar (SOAP, 2009).

Técnica utilizada: Dentro de uma capela de exaustão, dissolvia-se 5 g do mel com 5 ml de éter etílico com o auxílio de um bastão de vidro. Vertia-se a parte etérea em uma cápsula de porcelana e esperava-se até que o éter evaporasse completamente. Posteriormente, adicionava-se 0,5 mL de solução de resorcina a 1%, preparada no dia da realização da prova.

Segundo BRASIL (1981), o HMF que é, primeiramente, extraído pela ação do éter no mel, é revelado pela reação com a resorcina em meio ácido, dando um composto de condensação de coloração vermelho cereja imediata, onde a intensidade da coloração relaciona-se proporcionalmente com a concentração deste composto (Figura 44).

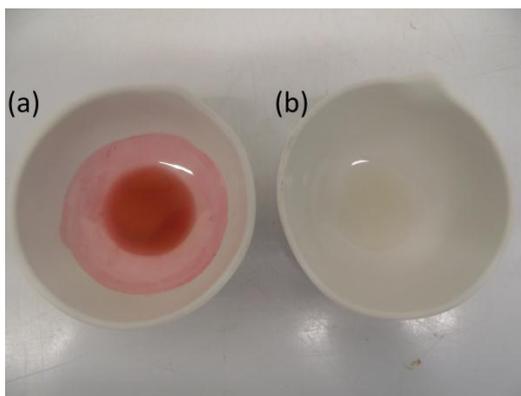


FIGURA 44. Reação de Fiehe. (a) Alta concentração de HMF. (b) Resultado esperado na reação (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 5.3.4.3 Determinação de HMF

Prova que permite quantificar o HMF presente no mel, aplicada principalmente em casos de positividade na reação de Fiehe para classificar se o produto está fora do limite máximo permitido, estabelecido pela IN 11, que é de 60 mg/kg (BRASIL, 2000).

Técnica utilizada: transferia-se para um balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de um bastão de vidro, 5 g do mel previamente pesado em um béquer e diluído com, no máximo, 25 mL de água destilada. Posteriormente, adicionava-se 0,5 mL de solução de Carrez I (Ferrocianeto de Potássio a 15%) seguido de ligeira homogeneização, e então adicionava-se 0,5 mL de solução de Carrez II (Acetato de Zinco 30%), e completava o volume do balão com água destilada.

A solução obtida era submetida a etapa de filtração, descartando os primeiros 10 mL do filtrado. Após filtração, pipetava-se 5 mL do filtrado para 2 tubos de ensaio, e adicionava 5 mL de água destilada em um dos tubos e no outro 5 mL de bissulfito de sódio 0,2% (solução preparada no dia da realização da prova), sendo esta a solução de referência para o espectrofotômetro. Homogeneizava-se os tubos com vortex e determinava-se a absorbância da amostra em 284 e 336 nm em cubeta de quartzo de 1cm. Se absorbância fosse maior de 0,6, fazia-se necessário a diluição da solução com água destilada e a outra com bissulfito de sódio a 0,10% na mesma proporção. Anotava-se os valores e obtia o resultado através da fórmula:

$$\text{HMFmg/Kg} = \frac{(\text{A284-A336}) \times 149,7 \times 5}{\text{Peso da amostra}}$$

#### 5.3.4.4 Prova de Lund

A prova de Lund se fundamenta pela capacidade do ácido tânico precipitar as substâncias albuminóides que são componentes normais do mel. Na presença de mel natural formar-se-á um depósito de 0,6 a 3mL. Em mel artificial não se forma depósito e em mel adulterado a volume formado será menor (BRASIL, 2000).

Técnica utilizada: pesava-se em um béquer 2 g de mel, o qual era dissolvido com 20 mL de água destilada. Transferia-se a solução para um tubo cônico graduado, onde era adicionado 5 mL de ácido tânico (preparado no dia da realização do teste) e água destilada até completar 40 mL. Tampava-se o tubo e aguardava 24 horas para efetuar a leitura, onde na presença de mel natural esperava-se a formação de um depósito de 0,6 a 3 mL.

#### 5.3.4.5 Determinação da atividade diastásica

A enzima diastase ( $\alpha$ -amilase) do mel digere a molécula de amido e está possivelmente envolvida na digestão do pólen. A enzima é sensível a altas temperaturas, sofre degradação quando o mel é aquecido e, por isso, sua ausência no mel passou a ser, em conjunto com a formação do HMF, um parâmetro indicativo de sobreaquecimento do produto (SILVA, 2013; MELO et al., 2003)

Técnica utilizada: Uma alíquota de 10 g da amostra a ser analisada era diluída em 20 mL de água destilada. Desta solução, 10 mL eram transferidos para dois tubos de ensaio (tubo A e B). A cada um dos dois tubos era adicionado 1 mL de solução de amido (preparado no dia da realização da prova). Um tubo era incubado em banho-maria (42-45°C) por 1h, para ativar a enzima, e o outro permanecia à temperatura ambiente por 1h (tubo controle). Após o período de incubação, 1 mL de solução de iodo era adicionado em cada tubo.

A solução que apresentava coloração esverdeada era considerada positiva (presença de diastase) e a solução que apresentava coloração azulada, era considerada negativa (ausência de diastase).

#### 5.3.4.6 Determinação de umidade

A umidade do mel é uma das características mais importantes por influenciar na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização e sabor. A umidade pode ser alterada após a retirada do mel da colméia, em função das condições de armazenamento depois da extração (CARVALHO et al., 2005), podendo implicar em um favorecimento da microbiota osmofílicas. De acordo com a legislação brasileira o teor de umidade não deve ser superior a 20% (BRASIL, 2000)

Técnica utilizada: iniciava-se a análise pela calibração do refratômetro de Abbé (Figura 45) utilizando uma gota de água destilada. Em seguida pingava-se uma gota de mel e procedia a leitura, anotando a temperatura da sala e do índice de refração. Para cada grau acima de 20°C adicionava-se 0,00023 e para cada grau abaixo de 20°C subtraía-se 0,00023 no índice de refração. Sendo o método universalmente recomendado para a determinação da umidade do mel, o método por refratometria a 20°C e a interpretação era feita através da tabela de Chataway.



FIGURA 45. Refratômetro de Abbé (Fonte: Arquivo pessoal).

#### 5.3.5 Análises físico-químicas da água

As substâncias presentes na água determinam seu conceito de qualidade estando relacionados com seu uso e características por ela apresentadas. Um conjunto de parâmetros compõe o padrão de potabilidade, que tornam a água própria para o consumo humano (BRASIL, 2006). Esses parâmetros são estabelecidos pela Portaria nº 518/04, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

Cada amostra de água tratada era submetida às análises sensoriais (cor, odor e aspecto), pH, dureza total, nitrogênio amoniacal (NA) e cloro residual livre (CRL), e quando a amostra de água não era tratada além das análises citadas, com exceção da prova CRL, era realizado a prova de matéria orgânica (MO).

#### 5.3.5.1 Análises Sensoriais

Para avaliação sensorial transferia-se uma amostra de água para um béquer de vidro e avaliava a cor, o odor e o aspecto, onde deveria resultar em incolor, inodoro e límpida respectivamente.

#### 5.3.5.2 pH

O pH representa a intensidade das condições ácidas ou alcalinas do meio líquido por meio da medição da presença de íons hidrogênio ( $H^+$ ), abrangendo a faixa de 0 a 14, onde apresenta condições ácidas quando inferior a 7 e condições alcalinas quando superior a esse mesmo valor. A dissolução de rochas, a fotossíntese e despejos domésticos e industriais são fontes que alteram o pH. Quando encontrado em valores baixos na água de abastecimento, contribuem para sua corrosividade e agressividade, enquanto incrustações são possibilidades pelo pH em valores elevados (BRASIL, 2006).

Técnica utilizada: transferia-se uma amostra de água, para um béquer de vidro de 50 mL ou de 100 mL. Fazia-se a leitura utilizando o pHmetro previamente calibrado. Onde esperava-se como resultado dentro do padrão, valores entre 6,0 a 9,5 (BRASIL, 2004).

#### 5.3.5.3 Nitrogênio amoniacal (NA)

A presença de amônia na água pode ser resultante da desaminação de compostos orgânicos que contêm nitrogênio por atividade microbiana ou pela hidrólise da uréia. Pode também ter origem durante tratamento da água, devido a combinação com o cloro (cloroaminas) (SOAP, 2009). Portanto, para garantir a potabilidade da água, o resultado esperado é a ausência do NA.

Técnica utilizada: transferia-se 50 mL da amostra previamente homogeneizada para uma proveta com tampa. Adicionava-se 1 mL de tartarato duplo de sódio e potássio e 2 mL do reagente de Nessler, seguido de agitação. Nos casos positivos e negativos verificava-se uma coloração amarelo intenso e branco ou ligeiramente amarelo, respectivamente.

O tartarato duplo de sódio e potássio é muito alcalino e tenta romper as ligações com carbono (C). O reagente de Nessler (iodeto de mercúrio), quando adicionado a uma solução diluída de amônia, forma um composto de cor amarelada, o qual pode flocular após certo tempo (LUTZ, 2005).

#### 5.3.5.4 Dureza

A dureza total é calculada como sendo a soma das concentrações de íons cálcio (Ca) e magnésio (Mg) na água, expressos como carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). A dureza de uma água pode ser temporária ou permanente. A dureza temporária, também chamada de dureza de carbonatos, é causada pela presença de bicarbonatos de Ca e Mg. Esse tipo de dureza resiste à ação dos sabões e provoca incrustações. É denominada de temporária porque os bicarbonatos, pela ação do calor, se decompõem em gás carbônico, água e carbonatos insolúveis que se precipitam (FUNASA, 2006).

A dureza permanente, também chamada de dureza de não carbonatos, se dá decorrente à presença de sulfatos, cloretos e nitratos de Ca e Mg, que também resiste à ação dos sabões, mas não produz incrustações devido seus sais serem muito solúveis na água. Não se decompõe pela ação do calor (FUNASA, 2006).

A portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde estabelece para dureza o teor de 500 mg/L em termos de  $\text{CaCO}_3$  como o valor máximo permitido para água potável (BRASIL, 2004).

Técnica utilizada: em um erlenmeyer de 250 mL, pipetava-se 100 mL da amostra homogeneizada, com pipeta volumétrica. Adicionava-se 2 mL de solução tampão para dureza e um pouco de Negro de Eriocromo T (pó), fazendo com que a solução se tornasse roxa. Posteriormente, titulava-se com EDTA (ácido

etilenodiamino tetra-acético) 0,01 até a solução virar de roxo para azul (Figura 46). Ajustava o resultado através da fórmula:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{V \times \text{fc (EDTA)} \times 1000}{\text{Volume amostra}}$$

Onde V = volume do EDTA utilizado para viragem da cor da solução; fc = fator de correção da solução de EDTA.



FIGURA 46. Prova da dureza da água, sendo o erlenmeyer "A" depois da titulação e o erlenmeyer "B" antes da titulação (Fonte: Arquivo pessoal).

Classificando a água como mole, quando a titulação resultava em  $<50\text{mg CaCO}_3/\text{L}$ ; com dureza moderada, quando resultava em  $50 - 150 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ ; como dura quando resultava em  $150 - 200 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ ; e muito dura quando o resultava em  $> 300 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ .

Se ao colocar o indicador, a solução apresentasse a coloração azul, era assumido como ausência de carbonato de cálcio na amostra.

A reação tem como princípio o complexo que o EDTA faz com o íons. A solução tampão é um sal diluído em hidróxido de amônio, utilizado para eliminar o Mg. O  $\text{Mg(OH)}_2$  precipita, possibilitando expressar o resultado em  $\text{mg CaCO}_3$ . O negro de ericromo T tem em sua composição, sal que também neutraliza o Mg (LUTZ, 2005).

#### 5.3.5.5 Cloro residual livre (CLR)

O cloro é um produto químico utilizado na desinfecção da água. Sua medida é importante e serve para controlar a dosagem que está sendo aplicada e também para acompanhar sua evolução durante o tratamento (FUNASA, 2006).

A portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde determina a obrigatoriedade de se manter em qualquer ponto na rede de distribuição a concentração mínima de cloro residual livre de 0,2 mg/l. Recomenda, ainda, que o teor máximo seja de 2,0 mg/l de cloro residual livre em qualquer ponto do sistema de abastecimento (BRASIL, 2004).

Os principais produtos utilizados são: hipoclorito de cálcio, cal clorada, hipoclorito de sódio e cloro gasoso (FUNASA, 2006).

Técnica utilizada: transferia-se 100 mL da amostra em proveta. E então adicionava-se 5 mL de solução de orto-toluidina e realizava-se a leitura em espectrofotômetro (previamente ligado por 10 min e realizado a leitura da absorbância no comprimento de onda de 465 nm).

$$CRL = 3,6470 \cdot (A + 0,0027)$$

A orto-toluidina em meio ácido é oxidada pelo cloro residual livre e combinado produzindo um composto amarelo proporcional à quantidade de cloro presente (BRASIL, 1981), portanto, quanto mais amarela a amostra ficar após a adição de orto-toluidina, maior a quantidade de cloro contida na amostra (LUTZ, 2008).

#### 5.3.5.6 Matéria orgânica

Esta análise verifica a quantidade de O<sub>2</sub> presente na amostra. A água possui normalmente 10% de O<sub>2</sub> (LUTZ, 2005).

Técnica utilizada: adicionava-se 100 mL da amostra com pipeta volumétrica em um erlenmeyer de 500 mL. Colocava-se 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25% também com pipeta volumétrica. A amostra era aquecida e quando começava sair vapor (T > 65° C), adicionava-se 10 mL de permanganato de potássio a 0,0125N. Cronometrava-se mais 10 min no fogo e adicionava-se 10 mL de solução de ácido oxálico 0,0125N. Por fim homogeneizava-se a amostra. Caso ficasse transparente ou levemente amarelado, havia a necessidade de titular com permanganato de potássio 0,0125N

até ficar levemente rosa. Se a solução ficasse rósea quando adicionava-se o ácido oxálico, aceitava-se como negativo para presença de matéria orgânica.

O ácido Oxálico faz reação de oxirredução com o permanganato. Este se liga ao  $O_2$  da  $H_2O$  e isso depende de meio ácido e temperatura, tornando assim o meio róseo na água sem quantidade de  $O_2$  superior aos 10% normais da água (LUTZ, 2008).

Padrão: < 2 mg/L (RIISPOA, 1968).

## 6. CONCLUSÃO

Os micro-organismos estão intimamente associados com a disponibilidade, a abundância e a qualidade do alimento para consumo humano. Os alimentos são facilmente contaminados na natureza, durante manipulação e processamento. Após ter sido contaminado, este serve como meio para multiplicação de micro-organismos, podendo mudar as características físicas e químicas do alimento, causar sua deterioração, além do potencial envolvimento em casos e surtos de intoxicações e infecções transmitidas por alimentos.

Assim, se torna de extrema importância as análises microbiológicas e físico-químicas de alimentos, pois é responsável por certificar a inocuidade, identidade e qualidade de um gênero alimentício que será comercializado ou identificá-lo como fonte de risco potencial contribuindo vastamente para a saúde pública.

Com as contribuições que a microbiologia e análises físico-químicas de alimentos fornecem para a produção, comercialização de produtos e à saúde pública, esta área tende a crescer juntamente com as exigências do mercado consumidor, que a cada dia mais exige seu abastecimento com alimentos atestados.

O estágio curricular proporcionou a consolidação do conteúdo teórico aprendido durante o período acadêmico através do conhecimento prático acompanhado na rotina laboratorial, permitindo também o relacionamento social com outros profissionais que atuam na área, possibilitando a troca de informações e aquisição de experiências vividas por eles, aprimorando meus conhecimentos e demonstrando a importância da busca constante de aprendizado.

Nos dias atuais é crescente o número de Médicos Veterinários que atuam junto à análise de alimentos de origem animal, visto que a classe profissional é altamente capacitada a este fim, sendo um profissional que além de estar presente nas fases da produção, pode atuar junto a indústria alimentícia, no final da cadeia produtiva, tendo grande importância à saúde pública.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™. Guia de interpretação para contagem de aeróbios. Campinas, 2013.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. Revista Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.30, n.6, p. 1139-1145, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 171 de 4 de setembro de 2006. Regulamento técnico para o funcionamento de bancos de leite humano. Diário Oficial da União, Brasília, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa avalia risco da presença de formol e uréia no leite. Informe técnico nº 53. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acessado em: 04 de outubro de 2013.

BIOCLIN. Instrução de uso - kit fosfatase alcalina. Belo Horizonte, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - Métodos físicos e químicos, v. II, Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Instrução Normativa nº 68, Brasília, 12 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Instrução Normativa nº 62, Brasília, 29 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Instrução Normativa nº 11, 20 de outubro de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa nº 62, Brasília, 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria nº 518, Brasília, 25 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual integrado de vigilância e controle da febre tifóide/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília, 2006. 213p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Brasília, 1980.

CAPIOTTO, G. M.; LOURENZANI, W. L. Sistema de gestão de qualidade na indústria de alimentos: caracterização da norma ABNT NBR ISO 22.000:2006. In: Sociedade brasileira de economia administração e sociedade rural (SOBER), 48., Campo Grande, 2010. Estrutura, evolução e dinâmica dos sistemas agroalimentares e cadeias agroindustriais. Campo Grande: SOBER, 2010. p. 1 -20.

CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; SANTOS, L. R.; PILOTTO, F.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; ROCHA, S. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. Brazilian Journal of Microbiology, v. 37, p. 368-371, 2006.

CAROLINO, M. I.; RODRIGUES, M. I.; BRESSAN, M. C.; CAROLINO, N.; ESPADINHA, P.; GAMA, L. T. pH e força de corte da carne de bovinos alentejanos e mertolengos. Arch. Zootec, v. 58, p. 581-584, 2009.

CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M. O. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005.

CARVALHO, I. T. Microbiologia dos alimentos. Recife: EDUFRPE, 2010.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acessado em: 11 de agosto de 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. EMPRES Food Safety - Emergency Prevention System for Food Safety, Strategic Plan, 2010.

FINCO, F. B. D. A.; MOURA, L. L.; SILVA, I. G. Propriedades físico-químicas do mel de *Apis mellifera* L. Ciênc. Tecnol. Aliment. vol. 30, nº 3, Campinas, 2010.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Atmed, Porto Alegre, 2002. p. 424.

FRANCO, B. D. G. M.; LANGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2005.

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. Manual prático de análise de água. 2. ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 1.ed. digital. São Paulo: Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LIPOA. Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Apostila: Controle de qualidade na cadeia do leite. Londrina, 2013.

LOUREIRO, E. C. B. Epidemiologia descritiva de Salmonella em ecossistemas aquáticos de diferentes áreas do Estado do Pará. Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

MARCHI, D. M.; BAGGIO, N.; TEO, C. R. P. A.; BUSATO, M. A. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no município de Chapecó, estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 20 (3), p. 401-407, 2011.

MELO, Z. F. N.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C.; Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.5, n.1, p. 89-99, 2003.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; MESQUITA, L. X.; MARACAJÁ, P. B. As análises de mel: Revisão. Caatinga (Mossoró,Brasil), v.22, n.2, p.07-14, abril/junho de 2009.

PANCOTTO, A. P. Análise das características físico-químicas e microbiológicas do leite produzido no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Bento Gonçalves. 2011. 34 f. TCC (Trabalho de Conclusão em Tecnologia em Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2011.

PARANÁ. Programa leite das crianças. Decreto Estadual nº 1279, de 14 de maio de 2003. Disponível em: <[http://www.leite.pr.gov.br/arquivos/File/legislacao/regime\\_especial.pdf](http://www.leite.pr.gov.br/arquivos/File/legislacao/regime_especial.pdf)>. Acessado em: 31 de agosto de 2013.

PONCIANO R. J. F. Avaliação da qualidade higiênica da produção de leite de pequenos ruminantes e de queijo fresco da região do Rabaçal. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, 2010.

PREBAF. Programa Nacional de Monitoramento de Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Relatório do monitoramento de prevalência e do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2008.

REITER, M. G. R.; FIORESE, M. L.; MORETTO, G.; LOPEZ, M. C.; JORDANO, R. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, v.70, n.7, p. 1723-1725, 2007.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; FITTÉL, A. P.; NASCIMENTO, V. P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enterica subsp. Enterica sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.73, n.3, p. 357-360, 2006.

RODRIGUES, M. X.; BITTENCOURT, J. V. M.; MATOS, E. A. S. A.; REIS, D. R. Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. *Latin American journal of business manegement*, v. 2, n. 2, p. 54-81, jul-dez, 2011.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*, v. 46, n. 6, dezembro, 2007.

SANTOS, L. M.; ROCHA, J. R.; CASALE, D. S.; PINHEIRO JUNIOR, O. A.; Importância do médico veterinário na produção de alimentos de origem animal, para a sociedade: revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônico de Medicina Veterinária*, ano IV, número 8, janeiro de 2007.

SCALLAN E.; HOEKSTRA R.M.; ANGULO F.J.; TAUXE R.V.; WIDDOWSON M.; ROY S.L.; JONES J.L.; GRIFFI P.M. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. p.7-15. 2011.

SILVA JR, E.A. Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviço de Alimentação. 6 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 214p.

SILVA, C. V. Características físico-químicas de mel de capixingui e silvestre da região de ortigueira - PR. Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Londrina, 2013.

SILVA, F. F. Qualidade do leite materno em banco de leite humano: aspectos bacteriológicos, físico-químicos e perfil de aminas bioativas. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SILVA, J. G. Análise físico-químicas do leite bovino cru e do leite pasteurizado integral beneficiado em um laticínio no município de Angicos - RN. Angicos, RN: Universidade Federal Rural do Semi-árido - Campus Angicos, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. R.; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos. 3. ed., São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SOAP. Serviço de Orientação à Alimentação Pública. Apostila de Métodos de análises microbiológicas de alimentos. Botucatu, 2009.

STEPHENS, J. W.; DIKEMAN, M. E.; UNRUH, J. A.; HAUB, M. D.; TOKACH M. D. Effects of pre-rigor injection of sodium citrate or acetate, or post-rigor injection of phosphate plus salt, on post-mortem glycolysis, pH decline, and pork quality attributes. *Meat Sci.*, 74: 727-737, 2006.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 28, n. 3, p. 449-454, jul./set. 2007.

TÉO, C. R. P. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. *Salmonella* spp.: the egg as vehicle of transmission and the implications of antimicrobial resistance for public health. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.26, n.2, p. 195-210, 2005.

TRONCO, V. M. Manual para inspeção da qualidade do leite. 3 ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2008.

UEL, Universidade Estadual de Londrina. Disponível em: <[http://www.uel.br/proplan/plano\\_diretor\\_2010\\_2015/texto\\_numerado\\_Plano\\_Diretor.pdf](http://www.uel.br/proplan/plano_diretor_2010_2015/texto_numerado_Plano_Diretor.pdf)>. Acessado em: 24 de agosto de 2013.

UEL, Universidade Estadual de Londrina. Disponível em: <<http://www.uel.br/laboratorios/inspecao/portal/>>. Acessado em: 24 de agosto de 2013.

UNESP, Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <<http://www.unesp.br/>>. Acessado em: 08 de Outubro de 2013.

VIEIRA, I. I. F.; DANTAS, B. P. A.; FERREIRA, F. C. M.; CARVALHO, R. B. A. C.; FREIRE, I. B.; NETO, E. J. S. Efeitos da utilização do formaldeído em laboratórios de anatomia. *Revista Ciência Saúde Nova Esperança*, jun/2013.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista brasileira de Biociências, Porto Alegre, v.8, n. 1, p.44-48, 2010.