UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR PALOTINA

ANDRÉ LUIS VRIESMAN BENINCA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SETOR PALOTINA

PALOTINA

2016

ANDRÉ LUIS VRIESMAN BENINCA

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Supervisores: Prof. Ms. Fábio Sossai Possebon

M. V. César Plínio Mantuano Barradas

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

PALOTINA – PR

Dezembro de 2016

3

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMPUS PALOTINA

MEDICINA VETERINÁRIA

André Luis Vriesman Beninca

Med. Vet. Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Med. Vet. Prof. Ms. Fábio Sossai Possebon

Med. Vet. César Plínio Mantuano Barradas

O presente Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado e aprovado pela seguinte banca examinadora:

Prof. Doutor Luciano dos Santos Bersot

Orientador – Universidade Federal do Paraná Setor Palotina

Profa. Doutora Maíra Salomão Fortes

Universidade Federal do Paraná Setor Palotina

THIAGO HENRIQUE BELLÉ

M. V. Thiago Henrique Bellé

Universidade Federal do Paraná Setor Palotina

Palotina, 01 de dezembro de 2016.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço por estar vivo e poder desfrutar de todas as oportunidades que me foram dadas

A minha família que me transformou na pessoa que sou hoje. Meu pai, Venilton, e minha mãe, Magali, por mostraram-me que a vida é feita de momentos de dificuldades e felicidades, ensinando que o futuro depende daquilo que fazemos hoje. Ao meu irmão, Lincoln, cunhada Camila e sobrinho Davi, que sempre me motivaram a seguir empenhado durante a graduação.

Aos meus amigos de infância e graduação que me acompanham desde que fui criança e participaram da minha vida em momentos de alegria e tristeza, até os amigos que fiz durante a graduação. São grande parte daquilo que sou e que me motivam a ser cada dia melhor.

A Universidade Federal do Paraná, assim já agradecendo aos educadores que foram responsáveis por transmitir o conhecimento que possuem, sempre com excelência, em especial meu orientador Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot, peça importante no meu aprimoramento durante a graduação, com a oportunidade de desenvolver trabalhos científicos e a realmente saber o que é uma alma de pesquisador. A Rosana, Cibeli, Mallú, Kadígia e Tiago, que sempre estiveram presentes na rotina do laboratório dispostos a ajudar e tirar dúvidas, e pela convivência fora do laboratório.

RESUMO

O presente trabalho de conclusão de curso demonstra as atividades técnicas desenvolvidas no período de 25 de Julho à 23 de Setembro do ano de 2016 na Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP, campus de Botucatu, e no Serviço de Inspeção Federal do abatedouro de aves da Cooperativa Agroindustrial CVALE, situado no município de Palotina, Paraná, de 26 de setembro até o dia 10 de novembro de 2016. Atividades constantes da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório da Universidade Federal do Paraná, desenvolvidas no setor de Inspeção Sanitária de Alimentos e Produtos de Origem Animal sob orientação do Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot e sob a supervisão local do Prof. Ms. Fábio Sossai Possebon da UNESP. Contemplam-se neste trabalho os procedimentos de rotina de um laboratório de inspeção de produtos de origem animal. Procedimentos tais como análises microbiológicas e físico-químicas, procedimentos de coleta, acondicionamento das amostras, procedimentos analíticos, emissão de laudos, preparo de meios de cultura e higienização de equipamentos.

Devido à grande estrutura do laboratório, este presta serviços à universidade, onde coleta-se na cozinha do hospital universitário, alimentos preparados para neonatos, jovens e adultos, e água de diferentes pontos do campus. Há também trabalhos de pesquisa desenvolvidos pelos residentes do laboratório, os quais contam com a participação direta dos alunos em estágio. Na Cvale, foi feito acompanhamento documental do abate de mais de 350.000 aves por dia. Documentação essa preconizada pelas atividades de rotina do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura.

Palavras-chave: inspeção; alimentos; análise microbiológica; análise físico-química.

LISTA DE FOTOS

Foto 1 -	RECIPIENTES ISOTÉRMICOS USADOS PARA COLETA.....	16
Foto 2 -	SALA DE RECEPÇÃO DE AMOSTRAS.....	16
Foto 3 -	GELADEIRA DE ESTOQUE DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE.	16
Foto 4 -	GELADEIRA DE ESTOQUE DE AMOSTRAS ANALISADAS....	16
Foto 5 -	FLUXOS PARA PESAGEM E REPIQUE DE AMOSTRAS.....	17
Foto 6 -	SALA DE INCUBAÇÃO E REPIQUE.....	17
Foto 7 -	BANCADA DA SALA DE INCUBAÇÃO E REPIQUE.....	17
Foto 8 -	SALA DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA.....	18
Foto 9 -	SALA DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA.....	18
Foto 10 -	SALA DE PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA.....	18
Foto 11 -	SALA DE PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA.....	18
Foto 12 -	SALA DE LAVAGEM.....	19
Foto 13 -	SALA DE LAVAGEM.....	19
Foto 14 -	ESCOAMENTO DO CONTEÚDO DA TORNEIRA.....	22
Foto 15 -	FLAMBAGEM DA TORNEIRA.....	22
Foto 16 -	TUBOS DE CALDO LAURIL (LST)	25
Foto 17 -	TUBOS DE CALDO VERDE BRILHANTE (VBBL) A 2%.....	25
Foto 18 -	TUBOS DE CALDO LAURIL (LST)	26
Foto 19 -	TUBOS DE CALDO *Escherichia coli* (EC) POSITIVOS.....	26
Foto 20 -	PETRIFILM™ AC COM COLÔNIAS POSITIVAS DE MESÓFILOS.....	27
Foto 21 -	PLACA DE ÁGAR BAIRD-PARKER (BP) COM COLÔNIAS ATÍPICAS DE *Staphylococcus aureus*	28
Foto 22 -	TUBOS DE TETRATIONATO (TT) E RAPAPORT-VASSILIADIS (RV)	30
Foto 23 -	PLACAS DE XILOSE LISINA DESOXICOLATO (XLD) COM COLÔNIAS ATÍPICAS DE *Salmonella sp*.....	31
Foto 24 -	PLACA DE ÁGAR BISMUTO SULFITO (BS) COM COLÔNIAS ATÍPICAS DE *Salmonella sp*.....	31
Foto 25 -	AVALIAÇÃO DO PH DA CARNE.....	32
Foto 26 -	AMOSTRA PARA PROVA DE ÉBER EM BANHO-MARIA.....	33

Foto 27 - AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS, RESPECTIVAMENTE EM REAÇÃO DE ÉBER PARA H_2S..... . 33

Foto 28 - AMOSTRA POSITIVAS PARA REAÇÃO DE ÉBER (NH_3)..... 33

Foto 29 - ACIDEZ DORNIC 34

Foto 30 - ACIDEZ DORNIC DE LEITE MATERNO..... 34

Foto 31 - DENSIDADE RELATIVA DO LEITE..... 35

Foto 32 - CRIOSCÓPIO..... 36

Foto 33 - SOLUÇÕES PARA CALIBRAÇÃO DO CRISCÓPIO 36

Foto 34 - ESTABILIDADE DA CASEÍNA AO ALIZAROL 68°..... 36

Foto 35 - DISCO DE ACKERMANN..... 37

Foto 36 - AMOSTRA POSITIVA PARA ADIÇÃO DE PERÓXIDO..... 38

Foto 37 - TUBO NEGATIVO E POSITIVO PARA ATIVIDADE DE FOSFATASE, RESPECTIVAMENTE..... 39

Foto 38 - TEOR DE GORDURA POR BUTIRÔMETRO DE GERBER..... 40

Foto 39 - MENSURAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LEITE MATERNO EM CAPILAR..... 41

Foto 40 - TITULAÇÃO DA ACIDEZ DO MEL..... 42

Foto 41 - MENSURAÇÃO DO VOLUME UTILIZADO DE SOLUÇÃO DE TITULAÇÃO..... 42

Foto 42 - TUBO DE PROVA DE LUND ANTES DA PRECIPITAÇÃO..... 43

Foto 43 - LEITURA DA PROVA DE LUND APÓS 24 HORAS COM PRECIPITADO..... 43

Foto 44 - RESULTADO NEGATIVO PARA PROVA DE FIEHE..... 43

Foto 45 - TUBOS COM AMOSTRAS POSITIVAS PARA DIASTASE..... 44

Foto 46 - REFRATRÔMETRO DE ABBÉ..... 45

Foto 47 - PROVA DE RANCIDEZ NEGATIVA..... 46

Foto 48 - CINZAS EM DESSECADOR..... 50

Foto 49 - AMOSTRAS TRITURADAS DE ELEMENTOS DE CESTA BÁSIC EM DESSECADOR PARA AVALIAÇÃO DA UMIDADE.. 50

Foto 50 - AMOSTRAS EM DESTILAÇÃO DE PROTEÍNA..... 51

Foto 51 - AMOSTRAS EM AVALIAÇÃO DE EXTRATO ETÉREO EM SOXHLET..... 52

Foto 52 - VISTA AÉREA DO ABATEDOURO DA CVALE..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

APT – Água Peptonada Tamponada

BAM – Manual de Métodos Analíticos Bacterianos

BHI - Caldo cérebro-coração infusão

BPF – Boas Práticas de Fabricação

BS – Ágar Bismuto-Sulfito

CRL – Cloro residual livre

DHVSP - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

DVA – Doenças Veiculadas por Alimentos

EC – Caldo *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAMESP – Faculdade Método de São Camilo

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HMF - Hidroximetilfurfural

IN – Instrução Normativa

LIA – Ágar Lisina Ferro

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NMP – Número Mais Provável

ONU – Organização das Nações Unidas

PCA – Ágar Padrão para Contagem

PPHO – Procedimento Padrão de Higiene Operacional

PSO - Procedimentos Sanitários Operacionais

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SBPC - Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência

SS – Solução salina

STND – Serviço Técnico de Nutrição e Dietética

TSI – Ágar Tríplice-açúcar Ferro

UV – Luz ultravioleta

VBBL - Caldo Verde Brilhante Bile Lactose

XLD – Ágar xilose lisina desoxicolato

PCC – Ponto Crítico de Controle

IQF – Produtos de Congelamento Rápido Individual

DIF – Departamento de Inspeção Final

CMS – Carne Mecanicamente Separada

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 13

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO NA UNESP..... 15

2.1 Instalações **15**

2.1.1 Sala de recepção **15**

2.1.2 Sala de estocagem de amostras **16**

2.1.3 Sala de pesagem **16**

2.1.4 Sala de incubação e repique **17**

2.1.5 Laboratório de análises físico-químicas **17**

2.1.6 Sala de preparo de meios **18**

2.1.7 Sala de lavagem **18**

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNESP..... 19

3.1 Coleta de suabes de superfície para preparo de alimentos, equipamentos e mãos no hospital de Bauru **19**

3.2 Coleta de preparado lácteo e dieta fornecida aos pacientes do hospital da UNESP **20**

3.2.1 Coleta de água **21**

3.3 Análises microbiológicas..... **22**

3.3.1 Metodologia para pesagem **22**

3.3.2 Diluição de amostras **23**

3.3.3 Determinação de Número Mais Provável de coliformes totais..... **23**

3.3.3.1 Metodologia utilizada..... **24**

3.3.4 Determinação de Número Mais Provável de coliformes termotolerantes **25**

3.3.4.1 Metodologia utilizada **25**

3.3.5 Contagem de mesófilos aeróbios **26**

3.3.5.1 Metodologia utilizada **26**

3.3.6 Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva **27**

3.3.6.1 Metodologia utilizada **27**

3.3.7 Pesquisa de *Salmonella sp.* **28**

3.3.7.1 Metodologia utilizada **29**

3.4 Análises físico-químicas realizadas **31**

3.4.1 Análises físico-químicas de produtos cárneos **31**
3.4.1.1 Avaliação sensorial dos produtos cárneos..... **31**
3.4.1.2 pH **32**
3.4.1.3 Reação de Éber para ácido sulfídrico..... **32**
3.4.1.4 Reação de Éber para amônia **33**
3.4.2 Análises físico-químicas do leite **34**
3.4.2.1 Acidez **34**
3.4.2.2 Densidade relativa à 15°C **35**
3.4.2.3 Crioscopia eletrônica **35**
3.4.2.4 Estabilidade ao alizarol a 68° **36**
3.4.2.5 Extrato seco total por método indireto..... **37**
3.4.2.6 Adição de peróxido de hidrogênio **37**
3.4.2.7 Adição de formaldeído **38**
3.4.2.8 Atividade de peroxidase **38**
3.4.2.9 Atividade de fosfatase alcalina **39**
3.4.2.10 Presença de cloretos **39**
3.4.2.11 Teor de gordura (butirômetro de Gerber) **39**
3.4.2.12 Crematócrito **40**
3.4.3 Análises físico-químicas do mel **41**
3.4.3.1 Acidez **41**
3.4.3.2 Prova de Lund **42**
3.4.3.3 Prova de Fiehe **43**
3.4.3.4 Prova de atividade diastásica **44**
3.4.3.5 Determinação de hidroximetilfurfural (HMF) **44**
3.4.3.6 Umidade por refratometria **45**
3.4.4 Análise físico-química dos óleos..... **46**
3.4.4.1 Rancidez **46**
3.4.4.2 Quantificação de peróxidos **46**
3.4.5 Análise físico-química da água **47**
3.4.5.1 Avaliação sensorial da água **47**
3.4.5.2 pH **47**
3.4.5.3 Avaliação de nitrogênio amoniacal **47**
3.4.5.4 Dureza **48**

3.4.5.5 Quantificação de cloro residual livre (CRL) **49**
3.4.6 Análises bromatológicas **49**
3.4.6.1 Resíduos minerais fixos ou cinzas **49**
3.4.6.2 Quantificação de umidade **50**
3.4.6.3 Quantificação de proteínas **51**
3.4.6.4 Quantificação de extrato etéreo **52**
3.4.6.5 Titulação de cloreto de sódio **53**
4. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO NA CVALE..... 53
5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA CVALE..... 54
5.1 Inspeção Pré-operacional..... **56**
5.2 Inspeção Pré-abate **56**
5.3 Inspeção *ante-mortem*..... ..... **56**
5.4 Insensibilização, sangria, escaldagem e depenagem..... **57**
5.5 Evisceração..... **57**
5.6 Pré-resfriamento **58**
5.7 Seção de cortes ou espostejamento..... **59**
5.8 Frigorificação..... **59**
5.9 Expedição..... **60**
6. CONCLUSÃO 61
7. REFERÊNCIAS 62

1. INTRODUÇÃO

> Não há comida suficiente no mundo para alimentar todos. No centro do problema estão: a pobreza e a falta de poder, que impedem o acesso a alimentos nutritivos. Esta situação é agravada pela degradação constante dos solos, da água doce, dos oceanos e da biodiversidade. ” Também é de grande preocupação a previsão da ONU de que [...] o crescimento estimado de dois bilhões da população mundial até 2050. (ONU, 2012)

Assim sendo, será necessário um incremento na produção de alimentos da ordem de 70%, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) divulgado em 2009. Diante deste cenário que está sendo vislumbrado, o Brasil tem papel fundamental na produção de alimentos.

Durante a 65° Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) relatou-se que a produção nacional deve ser responsável por cerca de 40% do alimento do mundo, embasado em dados da FAO.

Diante destes fatos a demanda por alimentos aumenta, ocorre porém que esta não deve atingir a mesa da população senão cumprindo apenas o fator quantidade, mas também a qualidade, de modo que “... o alimento não pode estar submetido a qualquer tipo de contaminação, apodrecimento ou outros, consumidos de maneira digna(...)” (BELIK, 2009). É fundamental que boas práticas de produção sejam adotadas para minimizar os riscos, desde o momento no qual o alimento é cultivado até o ponto onde atinge o consumidor final, assim, a probabilidade da ocorrência de doenças veiculadas por alimentos (DVA) estará minimizada.

“Muitas das DVAs são causadas por micro-organismos patogênicos, os quais são responsáveis por sérios problemas de saúde pública e expressivas perdas econômicas” (OLIVEIRA *et al.,* 2010).

Segundo o Sistema de Informações Hospitalares do Ministério da Saúde, entre os anos de 1999 e 2004 ocorreram mais de 3.400.000 casos de pacientes hospitalizados por DVAs, por volta de 570.000 casos por ano...”, contudo, os dados epidemiológicos estão desatualizados e, muitas vezes, as ocorrências são subnotificadas, ou por falta de diagnóstico ou até mesmo por omissão do paciente quando os casos são tratados em casa.

Como ferramenta para monitorar a qualidade dos alimentos, fatores como técnicas laboratoriais foram desenvolvidas com o objetivo de avaliar os riscos aos

quais os consumidores podem estar expostos, qualidade de produção e processamento de alimentos, regulamentação e padronização das técnicas e procedimentos de análise instituídas por legislação emanadas por instituições capacitadas, no caso do Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), via manuais e normativas que determinam os padrões de identidade e qualidade e valores aceitáveis para cada produto.

No presente relatório, estão relatadas as atividades desenvolvidas primeiramente no Laboratório de Higiene e Inspeção de Alimentos e Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) da Universidade Estadual de São Paulo Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus Botucatu, situado no município de Botucatu durante o período de 25/07/2016 até 23/09/2016, totalizando 352 horas.

Neste local foram desenvolvidas análises de alimentos de origem animal e vegetal, tanto microbiológicas e físico-química, atividades de pesquisa, discussão de artigos e saídas à campo para coleta de material.

Complementando a carga horária, há o relatório referente ao estágio realizado na Cooperativa Cvale Agroindustrial, no Serviço de Inspeção Federal do abatedouro de aves do município de Palotina, realizado na data de 26/09/2016 até 10/11/2016, totalizando 250 horas, acompanhando os trabalhos de inspeção realizados pelos auxiliares de inspeção nas atividades de monitoramento dos processos.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO DA UNESP

O presente estágio foi realizado no Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) do Departamento de Higiene Veterinária e Inspeção Pública (DHVSP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) de Botucatu, sendo o orientador local o Prof. Ms. Fábio Sossai Possebon, o qual é responsável pelas atividades do laboratório e ministra a disciplina de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

A universidade localizada no centro-sul do Estado de São Paulo, na cidade de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior. (UNESP, 2011)

O SOAP realiza análises para setores internos da UNESP, como preparado para amamentação de neonatos, refeição para hospitalizados e água tratada, serviços a terceiros como análise de alimentos produzidos em hospitais de regiões próximas como do município de Bauru, São Paulo, carnes *in natura*, ovos, mel, até mesmo produtos de origem vegetal como óleos, farinha e cereais. No ano de 2001, o laboratório realizou cerca de 25 mil análises (UNESP, 2001).

2.1 Instalações

As instalações do laboratório estão situadas dentro da UNESP e são compostas pelas seguintes dependências.

2.1.1 Sala de recepção

Local onde chegavam as amostras para solicitação das análises, onde o pedido era registrado no sistema interno (FOTO 2), que contêm todas as informações como: tipo de amostra, análises solicitadas, responsável pela coleta, temperatura da amostra e etiquetagem para controle interno. Também é feita a inspeção visual do estado de acondicionamento da amostra (FOTO 1).

FOTO 1. Recipientes isotérmicos usados para coleta (Fonte: Arquivo pessoal).

FOTO 2. Sala de Recepção de Amostras (Fonte: Arquivo Pessoal).

2.1.2 Sala de Estocagem de Amostras

É o local composto por equipamentos de refrigeração, onde as amostras são acondicionadas por um curto prazo de tempo, compreendido entre a recepção e a pesagem do material. Neste ambiente, também estocam-se as alíquotas das amostras para eventual repetição da análise (FOTOS 3 E 4).

FOTO 3. Geladeira de estoque de amostras para análise. (Fonte: Arquivo pessoal).

FOTO 4. Geladeira para estoque de amostras analisadas. (Fonte: Arquivo pessoal).

2.1.3 Sala de Pesagem

Ambiente onde as embalagens das amostras são higienizadas com algodão embebido em álcool 70%, abertas com material estéril e pesadas. Também é onde ocorre a etapa inicial das análises compostas por diluição e fase de enriquecimento ou plaqueamento. Os equipamentos eram compostos por: capela de fluxo horizontal (FIGURA 5) com luz ultravioleta, balança de precisão, pinça, tesoura, faca, luva de

aço, *stomacher*, pipetas de vidro estéreis de diferentes graduações, pipetador, pisseta de álcool 70% e bastão de vidro.

FOTO 5. Fluxos para pesagem e repique de amostras (Fonte: Arquivo pessoal).

2.1.4 Sala de Incubação e Repique

É o ambiente onde são realizadas as etapas de incubação, enriquecimento seletivo, testes bioquímicos e sorologia. O ambiente possuí uma bancada, dividida em área suja e limpa dividida apenas por concordância entre os técnicos e residentes (FOTO 7), geladeira para estoque de meios de cultura, duas estufas uma de 35°C e uma de 30°C, dois banho-marias com temperaturas de 41°C e 45,5°C (FOTO 6).

FOTO 6. Sala de incubação e repique (Fonte: Arquivo pessoal).

FOTO 7. Bancada da sala de incubação e repique (Fonte: Arquivo pessoal).

2.1.5 Laboratório de Análises Físico-químicas

Neste local são realizadas todas as análises físico-químicas do laboratório. (FOTOS 8 e 9).

FOTO 8. Sala de análises físico-química (Fonte: Arquivo pessoal)

FOTO 9. Sala de análises físico-química (Fonte: Arquivo pessoal)

2.1.6 Sala de Preparo de Meios

Ambiente no qual são preparados todos os meios de cultura necessários na rotina das análises e, onde a funcionário da UNESP responsável por este setor se permanece (FOTOS 10 e 11).

FOTO 10. Sala de preparo dos meios de cultura (Fonte: Arquivo pessoal).

FOTO 11. Sala de preparo dos meios de cultura (Fonte: Arquivo pessoal).

2.1.7 Sala de Lavagem

Ambiente onde era realizada a higienização e descarte de todo o material que foi utilizado no processo analítico. Também é equipado com autoclaves para esterilização prévia a lavagem das vidrarias utilizadas na pesagem, repique e incubação (FOTOS 12 e 13).

FOTO 12. Sala de lavagem (Fonte: Arquivo pessoal).

FOTO 13. Sala de lavagem (Fonte: Arquivo pessoal).

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio houveram várias oportunidades de auxiliar nas atividades de rotina, como análises microbiológicas e físico-químicas, participação nas atividades de pesquisa que estavam sendo desenvolvidas pelos residentes do laboratório, apresentação de artigos científicos para os integrantes do laboratório. Os estagiários acompanhavam um dos residentes em saída à campo para realizar coletas na cidade de Bauru-SP.

3.1 Coleta de suabes de superfície para preparo de alimentos, equipamentos e mãos no hospital de Bauru.

O Hospital Estadual de Bauru (HEB), possui uma área de 23.500 m² e é responsável por atender pacientes do município e região. Mensalmente são realizadas 10.000 consultas médicas, 600 cirurgias, 26.000 exames e 900 internações.

Oferece um serviço de alimentação e dieta para os pacientes internados, daí a importância da qualidade com a qual o alimento é preparado, dessa forma atendendo pacientes debilitados e em recuperação.

Ao realizar levantamento bibliográfico, percebe-se que há relatos de contaminações preocupantes em outras regiões do país. LIMA, *et al.,* (2005), analisaram-se 20 dietas enterais industrializadas onde 25% apresentaram contagens elevadas de coliformes totais, 10% com presença de *Escherichia coli* e 20% com alta contagem de mesófilos aeróbios. PINTO, *et al.,* (2004), de 50 amostras de suabe de superfície e 4 dietas enterais preparadas na cozinha do hospital, 2 dietas enterais mostraram

presença de *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella*. Nos suabes de superfície, verificou-se a presença de *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca.*

A coleta realizada gerou 10 unidades analíticas, sendo três placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA) que foram distribuídas em locais indicados pela nutricionista responsável pelo local, como: em cima de divisórias e bancadas que não estavam em uso, as quais permaneceram abertas enquanto as outras coletas eram realizadas.

As outras 7 coletas foram por suabe, sendo as seguintes: tábua de manipulação numa área de 100cm² (10x10cm), lâminas do picador de vegetais e lâmina de processador, mão de uma auxiliar de cozinha, banca de lactário numa área de 100cm^2, parede interna do copo de um processador de alimentos e parede interna de mamadeira previamente higienizada. Os suabes foram acondicionados em tubos com 10mL de solução salina 6,5%. As amostras foram analisadas para contagem de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A contagem de mesófilos aeróbios, coliformes totais e *E. coli* foram realizadas fazendo uso de Petrifilm™ AC e para *S. aureus,* usaram-se placas de ágar Baird-Parker. A metodologia de análise está descrita nos itens que seguem.

3.2 Coleta de preparado lácteo e dieta fornecida aos pacientes do hospital da UNESP

O laboratório realizava prestação de serviço ao hospital, onde as amostras eram coletadas diariamente. Coletou-se preparado para neonatos e recém-nascidos, e de modo a cada 15 dias a água usada na preparação. A salada fornecida aos hospitalizados e a carne também. Estas amostras eram coletadas pelos funcionários do Serviço Técnico de Nutrição e Dietética (STND), onde era identificado na sua embalagem qual era o material e quem foi o responsável pela coleta.

As amostras eram acondicionadas em recipiente isotérmico e transportadas ao SOAP de imediato. Ao chegar no laboratório, as amostras eram etiquetadas e registradas no sistema interno para posteriormente serem analisadas, foram acondicionadas nos refrigeradores enquanto o laboratório era preparado para dar início ao procedimento analítico.

Diariamente, o SOAP realizava análise para o STND do hospital, o qual gerava dois produtos para coleta, tais poderiam ser dois preparados lácteos que

eram destinados à neonatos ou um preparado lácteo e uma água utilizada na diluição do mesmo.

As amostras eram acondicionadas em recipientes plásticos estéreis idênticos aos que seriam destinados aos pacientes. As embalagens eram entregues com um volume mínimo de 200mL, identificadas com o tipo de preparo, responsável pela coleta e data, então de imediato eram acondicionadas em recipiente isotérmico e destinadas ao SOAP para análise de coliformes totais e termotolerantes, contagem mesófilos aeróbios e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

Duas vezes por semana, eram coletados vegetais que seriam fornecidos aos pacientes, também eram coletados prontos para serem servidos. As amostras foram acondicionadas dentro de um saco estéril identificando o alimento, o responsável pela coleta e a data. As análises requisitadas foram para coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Salmonella*.

Amostras de carne também foram fornecidas duas vezes por semana, apresentadas ainda crus, porém já fatiadas. Foram acondicionadas semelhantemente aos vegetais, mas a análise requisitada foi apenas para físico-química.

Dietas entéricas fornecidas aos pacientes também foram analisadas, acondicionadas de mesma maneira que a carne e a salada, porém as provas requisitadas foram de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, mesófilos aeróbios, *Salmonella*, *Bacillus cereus* e *Clostridium* sulfito redutor.

3.2.1 Coleta de Água

Para água eram feitas coletas em diferentes pontos do hospital em três ou quatro áreas, que eram pré-estabelecidas por um cronograma onde as coletas ocorriam semanalmente. Um residente era encarregado da coleta seguindo um sistema de rodízio.

As amostras em armazenadas em recipiente plástico estéril contendo 0,1 ml de tiossulfato de sódio à 1% para 100mL de amostra, com o fito de neutralizar o cloro residual para que este não interfira no resultado analítico, uma vez que, a água clorada tem função de reduzir a carga microbiana. Assim, as amostras eram ser analisadas de imediato. O procedimento exigia um recipiente isotérmico para

acondicionar as amostras, frascos para armazenamento das amostras, algodão, pinça, isqueiro e uma pisseta com álcool 70%.

O procedimento prevê abrir a torneira com um fluxo de água considerável para que o volume residual do encanamento fosse escoado. Enquanto isso, era feita a assepsia das mãos com álcool 70% e a seguir, um chumaço de algodão era pinçado e embebido em álcool. A torneira era fechada, o algodão aceso e o bocal da torneira era flambado. A seguir a torneira era novamente aberta e 100mL eram coletados e o frasco fechado. Este procedimento repetia-se em todos os pontos de coleta (FOTOS 14 e 15).

FOTO 14. Escoamento do conteúdo da torneira. (Fonte: Arquivo pessoal).

FOTO 15. Flambagem da torneira (Fonte: Arquivo pessoal).

As análises solicitadas foram para número mais provável de coliformes totais e termotolerantes e contagem de mesófilos aeróbios com objetivo de determinar a potabilidade.

3.3 Análises microbiológicas realizadas

3.3.1 Metodologia para pesagem

O procedimento de pesagem é realizado quando o produto que será analisado tem caráter sólido ou semi-sólido.

Primeiramente, é necessário que todo o material que entrará em contato direto com a amostra seja esterilizado, incluindo: bandejas, pinças e facas. A pesagem deve ser feita em capela de fluxo laminar previamente higienizada com álcool e exposta a luz ultravioleta (UV) por 15 minutos. Após a abertura da embalagem, deve-se colocar os sacos plásticos estéreis de pesagem em um suporte

na balança para tarar a balança. As alíquotas das amostras devem ser selecionadas de modo aleatório e asséptico até totalizarem 25 gramas ± 0,2g. Para amostras líquidas a etapa de pesagem não é necessária, então deve-se coletar 25mL ± 0,2mL para análise (BRASIL, 2003[a]).

3.3.2 Diluição de amostras

O procedimento de diluição é o procedimento realizado com o objetivo de reduzir a concentração de micro-organismos de uma substância (BRASIL, 2003[b]), sendo uma etapa crítica na precisão do resultado final. Na microbiologia de alimentos é empregada com o objetivo de tornar um produto passível de análise, devido ao seu estado físico que impossibilita a continuidade do processo ou a um número muito alto de contaminantes, o que dificulta a leitura dos resultados. Nas diluições feitas em laboratório, o procedimento de diluição em uma série de tubos foi realizado.

Para sólidos, são pesados 25 gramas ± 0,2g da amostra e transferidas ao saco estéril, então dentro de uma capela de fluxo laminar, adiciona-se ao saco contendo a amostra 225mL de água peptonada tamponada (APT), então coloca-se o recipiente num homogeneizador tipo *stomacher*, onde este será massageado por 60 segundos a 200rpm. Após homogeneizado o recipiente contendo caldo obtem-se a primeira diluição sendo a 10^{-1}, então o saco é aberto dentro da capela de fluxo laminar e com uma pipeta estéril, retira-se uma alíquota de 1mL do conteúdo que deve ser dispensada em um tubo de 9mL de caldo APT para que seja feita a diluição seguinte, no caso 10^{-2}, para mais diluições basta repetir o procedimento.

Em produtos líquidos, era necessário que houvesse a transferência de 1mL da amostra em 9mL do líquido diluente podendo ser solução salina (SS) ou APT, o qual após homogeneizado em agitador, assim resultaria na diluição 10^{-1}.

3.3.3 Determinação de Número Mais Provável de Coliformes Totais

Coliformes são bactérias Gram-, anaeróbias facultativas em forma de bastonetes, segundo FORSYTHE, (2002). São micro-organismos quantificados na microbiologia de alimentos pelo fato de ”... serem micro-organismos indicadores para servir como uma medida de eficiência de processamento e, estimar se há patógenos entéricos” (FORSYTHE, 2002).

“Micro-organismos indicadores devem ser detectáveis de maneira rápida, possuir histórico de associação com o alimento, estar presente quando o patógeno está presente e possuir taxa de crescimento equivalente ao patógeno” (FORSYTHE, 2002). Nos alimentos, a análise de coliformes tem como objetivo verificar uma possível contaminação por bactérias entéricas, como *E. coli.*

A técnica foi utilizada para água não tratada, água de bebedouro, preparado lácteo do hospital, salada e dieta enteral, suabe de mãos e superfícies.

3.3.3.1 Método de análise

A técnica utilizada é de Número Mais Provável (NMP) sendo um teste presuntivo que permite estimar a densidade de micro-organismo viáveis presentes numa amostra (BRASIL, 2003[c]). Foi amplamente utilizada para amostras de preparado lácteo, água, batido de frutas e salada. O seu protocolo baseia-se na diluição seriada de três tubos. Os tubos usados devem conter 9mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com um tubo invertido, chamado de Durhan que tem a função de reter os gases que podem estar presentes devido ao processo fermentativo causado pela presença de coliformes (FOTO 16). Em água e preparado lácteo a diluição de LST era feito até a 10^{-3}, sendo que a primeira fileira de tubos para a análise de água, continham caldo LST com o dobro da concentração, com o objetivo de aumentar as chances do micro-organismo multiplicar-se, enquanto nos outros tubos e eram utilizados 10mL da amostra. Após as diluições serem terminadas, os tubos de Lauril foram incubados em estufa por 35°C por 48 horas para a leitura. Os tubos que turvaram o meio e formou-se formação de gás em mais de 10% do volume do tubo de Durhan, foram considerados positivos. As combinações dos resultados das diluições eram determinadas pelo número de tubos positivos de uma diluição, seguido dos números positivos das diluições seguintes. O valor de NMP era dado por uma tabela, onde cada combinação possui o seu valor estimado em NMP/g ou ml. Para confirmação é necessário que uma alíquota do tubo positivo seja passada para tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose (VBBL) 2% (FOTO 17) e incubados a 36°C por 24 horas, aqueles os quais tiverem turvação do meio e formação de gás serão dados como positivos.

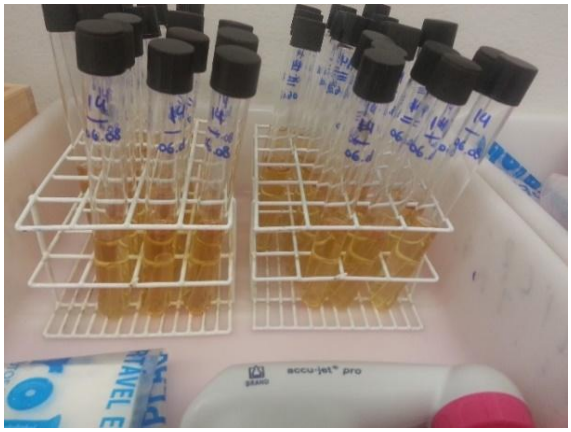

FOTO 16. Tubos de caldo Lauril (LST) (Fonte: Arquivo pessoal).

FOTO 17. Tubos de caldo verde brilhante (VBBL) a 2% (Fonte: Arquivo pessoal).

3.3.4 Determinação de NMP de coliformes termotolerantes à 45°C

Os coliformes termotolerantes, são os coliformes capazes de fermentar lactose a 45°C. “ *Escherichia coli* e algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais” (SILVA, *et al.,* 2006).

O objetivo da técnica é determinar se há presença de coliformes termotolerantes, que em caso positivo, podem indicar a presença de *E. coli*. Técnica realizada para água não tratada, água tratada, salada e dieta enteral.

3.3.4.1 Metodologia de análise

O esquema abaixo está descrito pela American Public Health Association, 1992 (SILVA, *et al.,* 2001). O teste presuntivo é realizado concomitantemente ao teste para coliformes totais. Após o período de incubação, os tubos que tiverem turvação do caldo LST (FOTO 18) e produção de gás evidenciada no tubo Durhan serão direcionas ao teste confirmativo, onde é passado uma alçada do tubo positivo de caldo LST, para um tubo contendo seis a oito mililitros de caldo *Escherichia coli* (EC) com tubos de Duran invertidos, após efetuada a inoculação, os tubos deverão ser incubados a 45,5°C por 24 horas em banho-maria. Os tubos que tiverem turvação e formação de gás serão considerados positivos (FOTO 19).

FOTO 18. Tubos de caldo Lauril (LST) (Fonte: Arquivo pessoal)

FOTO 19. Tubos de caldo *Escherichia coli* EC positivos (Fonte: Arquivo pessoal)

3.3.5 Contagem total de mesófilos aeróbios

Segundo JAY (2005), são micro-organismos que, quando presentes em elevado número nos alimentos, indicam condição precária de produção do ponto de vista higiênico-sanitário e tecnológico, podendo estar colocando em risco a saúde do consumidor.

"São usados para determinar grau de deterioração e tempo de vida de prateleira" (FRANCO & LANDGRAF, 1996), sendo que o produto lácteo é o principal alimento que pode sofrer alterações físico-químicas e sensoriais, sendo de alto nível de importância tratando-se da alimentação de recém-nascidos.

Análise realizada para preparado lácteo, suabe de superfície e de mãos.

3.3.5.1 Método de análise

O procedimento realizado foi o "Simplate", metodologia que faz uso de uma base quadriculada sobreposta pelo substrato desidratado que ao receber a amostra irá ocorrer a hidratação do meio formando o gel de ágar, no caso, usou-se Petrifilm™ AC 3M, sendo uma metodologia de uso simples, de curva de aprendizado rápida que reduz o uso de materiais no processo analítico. Trata-se de filmes que contêm uma base onde há o composto químico desidratado que compõe o ágar. A preparação da amostra e diluições seguem o processo descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2.

O Petrifilm™ deve ser inoculado com 1 ml da amostra e incubado a 35°C por 48±2 horas. A interpretação do resultado é feita pela contagem dos micro-

organismos que cresceram e tiveram coloração avermelhada, independente de intensidade na diluição desejada (FOTO 20). O resultado é dado pela seguinte fórmula: contagem= N x 10^x, onde “N” é o número de colônias contadas, e “x” é a diluição.

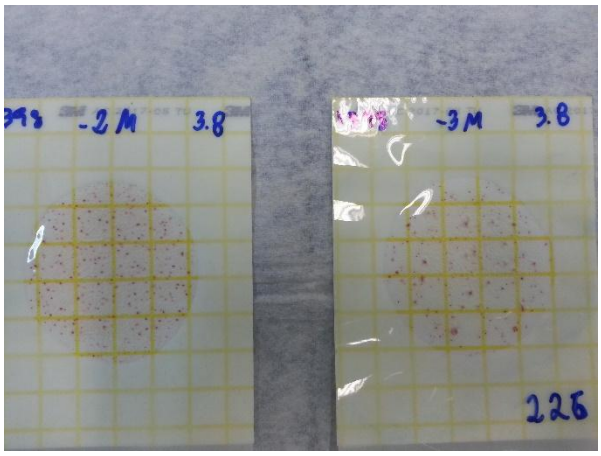

FOTO 20. Petrifilm™ AC de mesófilos (Fonte: Arquivo pessoal).

3.3.6 Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva

Segundo o BAM, 2011, o *Staphylococcus aureus* são cocos da família *Micrococcaceae*, Gram positivos, não-esporulados, imóveis e mesofílicos. “Sendo fermentadores de glicose com produção de ácido, tanto em anaerobiose como em aerobiose e que tem tolerância a concentrações de até 20% de NaCl” (SILVA, *et al*., 2001), sendo seu pH ideal de crescimento entre seis e sete. É um micro-organismo que está ligado à DVA frequentemente, de modo que “...possui grande potencial toxigênico...” (FORSYTHE, 2002).

Segundo Forsythe (2002, cap 5, p. 155) são micro-organismos presentes no ar, poeira, esgoto, água, leite, superfícies expostas ao processamento, humanos e animais. Do ponto de vista epidemiológico os humanos são os principais reservatórios quando se fala em alimentos processados, pois *Staphylococcus aureus* pode estar presente nas vias aéreas, garganta, pele e cabelo.

Solicitado para produtos que são altamente manipulados, como: alimentos preparados no hospital e preparado lácteo.

3.3.6.1 Métodos de Análise

A preparação da amostra e diluições seguem o processo descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2 e, o método analítico segue as instruções do BAM, 1998. As diluições

que serão analisadas, devem ser transferidas de modo asséptico 1 ml para as placas de Baird-Parker, o inóculo deve ser espalhado por toda a superfície da placa usando um bastão em “L” estéril até que o ágar absorva todo conteúdo, se não houvesse absorção completa de imediato as placas devem ser deixadas paradas até absorção total.

As placas devem ser incubadas à 35-37°C por 45±2 horas. Para a leitura dos resultados, devem ser selecionadas placas com 20-200 colônias típicas (colônia preta, com um halo esfumaçado branco e um terceiro halo transparente de 2-3mm), também podem ser vistas colônias atípicas (colônias pretas opacas ou brilhantes) (FOTO 21).

Durante o estágio não se observou colônias típicas para que seja feita a etapa confirmatória.

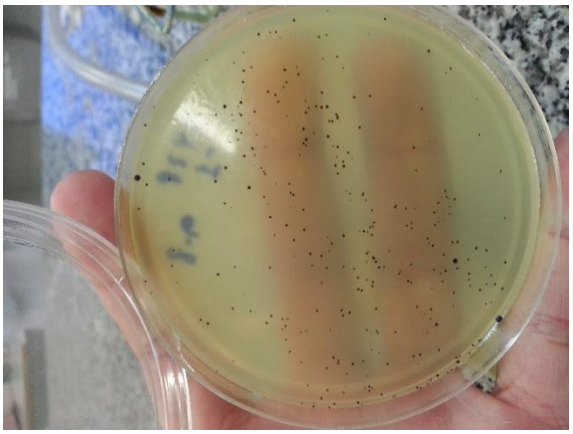

FOTO 21. Placa de ágar Baird-Parker (BP) com colônias atípicas de *Staphylococcus aureus* (Fonte: Arquivo pessoal).

3.3.7 Pesquisa de *Salmonella sp.*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos Gram negativos não produtores de esporos. Estas são divididas em dois grandes grupos: *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori* que são divididas em 8 grupos. São anaeróbios facultativos, produtores de gás a partir de glicose (exceto *S.* Typhi) e são capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono. A maioria é *móvel*, através de flagelos peritríquios, exceção feita a *S*. Pullorum*, s.* Gallinarum, que são imóveis. (FRANCO, *et al.*, 2001 e FORSYTHE, 2005). O pH ótimo para multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9 ou inferiores a 4 são bactericidas, a temperatura ideal é de 35-37°C.

Salmonella está intimamente associada a ingestão de alimentos contaminados como: carne bovina crua, aves domésticas, ovos, leite e derivados, peixes, molhos e temperos de salada. “A contaminação do alimento ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de manipulação ou por contaminação cruzada de alimentos crus com processados” (FORSYTHE, 2005).

Há muitos relatos de surtos de afecções alimentares por *Salmonella*, como pode ser visto em MADALOSO, *et al.,* (2008) onde 24 consumidores de um estabelecimento comercial desenvolveram quadro febril, êmese, cólica, náusea, onde 3 precisaram de internamento. Foi confirmada a presença de *S.* Enteritidis no equipamento usado na preparação do alimento.

Em KAKU, *et al*., (1995), houve um surto em uma escola no noroeste do estado de São Paulo afetando 211 indivíduos que desenvolveram o mesmo quadro clínico evidenciado no estudo de MADALOSO, et al., no caso houve preparo de maionese usando ovos crus.

Para MARCHI, *et al.* (2010) que faz um levantamento de surtos no município de Chapecó, Santa Catarina, de 61 surtos por ingestão de alimentos contaminados entre os anos de 1997 a 2005, 54% foi ligado à ingestão de *Salmonella,* também ligado a consumo de maionese preparada com ovo cru.

A Resolução de Colegiado n° 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em seu regulamento técnico sob padrões microbiológicos para alimentos, determina que *Salmonella* deve ser ausente em 25 gramas de alimento.

3.3.7.1 Método de Análise

As análises para pesquisa de *Salmonella* foram solicitadas para vitamina de frutas, dieta enteral e salada, seguindo o padrão estipulado pela Resolução de Colegiado (RDC) n° 12 de 2001 da ANVISA, BRASIL segundo a ISO 6579/2002

O procedimento de pesagem e diluição segue o mesmo das outras análises, no caso para a etapa de pré-enriquecimento, são pesados 25 gramas da amostra em um saco estéril então é adicionou-se 225mL de água peptonada tamponada estéril, seguido de homogeneização em *stomacher* por 230rpm por 60 segundos. A amostra deve ser incubada à 35°C por 24 horas.

Após incubada, passa para a etapa de enriquecimento seletivo, onde retirou uma alíquota de 1mL da água peptona tamponada que será incubada em 9mL de caldo tetrationato (TT) suplementado com 0,1 mL de iodo iodeto e 0,1mL de água

peptonada tamponada em caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) que possui verde malaquita e cloreto de magnésio que impede crescimento de Gram positivos (FOTO 22). Foram incubados á 35°C por 24 horas.

Inicia-se a etapa de plaqueamento diferencial. Os tubos de RV e TT são homogeneizados e, com uma alça estéril, retira-se uma alíquota de cada tubo que serão estriadas em placas de ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). O “desoxicolato é agente inibidor de Gram positivos e a lisina é incluída para diferenciação da *Salmonella*, de modo que a *Salmonella* utiliza a xilose (acidificação do meio adquirindo a coloração amarela) (FOTO 23) e em seguida usa a lisina (alcaliniza o meio adquirindo a cor vermelho-cereja) onde as colônias ditas típicas adquirem coloração enegrecida (Becton Dickinson™) e ágar Bismuto Sulfito (BS) possui extrato de carne que fornecerá substrato e sulfato ferroso que está incluso para produção de H_2S que deixará as colônias acinzentadas ou enegrecidas com brilho metálico (FOTO 24).

A etapa bioquímica presuntiva compreende pelo uso dos ágares: Triplo açúcar ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA), entretanto não houveram colônias típicas no processo de plaqueamento diferencial que fossem ditas típicas para prosseguir com o procedimento analítico.

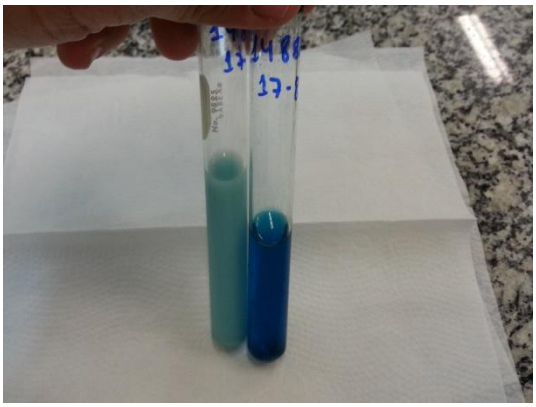

FOTO 22. Tubos de caldo tetrationato (TT) e Rappaport-Vassiliadis (RV) respectivamente (Fonte: Arquivo pessoal).

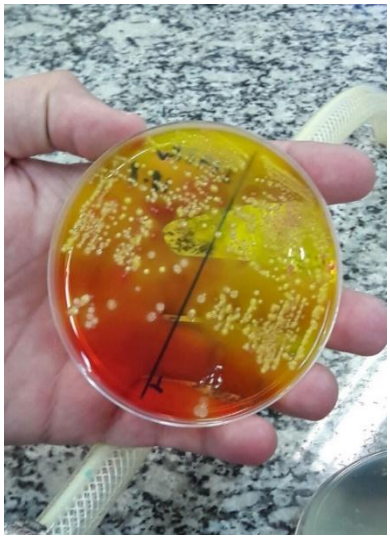

FOTO 23. Placa de ágar xilose lisina desoxicolato com colônias atípicas de *Salmonela sp.* (XLD) (Fonte: Arquivo pessoal).

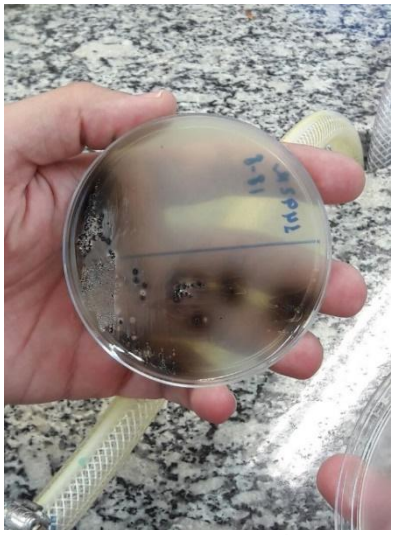

FOTO 24. Placa de ágar Bismuto Sulfito com colônias atípicas de *Salmonela sp* (BS) (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4 Análises Físico-químicas realizadas

A análise bromatológica permite que os alimentos sejam avaliados quanto a sua composição de componentes orgânicos e inorgânicos, sendo usados como critérios de qualidade e segurança. Os alimentos possuem padrões de composição, os quais garantem a sua identidade e, que devem ser respeitadas durante todo o processo de beneficiamento de forma que chegue até o consumidor final respeitando as características e normas que respeitem os padrões identidade e qualidade. (ADOLFO LUTZ, 2008).

Todas a técnicas utilizadas estão descritas no Manual de Métodos Físico-Químicas para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.

3.4.1 Análises físico-químicas de produtos cárneos

3.4.1.1 Avaliação sensorial

Para a avaliação sensorial de produtos cárneos deve-se considerar a aparência, gordura, cor, textura e odor, os quais devem ser característicos da carne. A aparência deve ser de uniformidade do corte, sem acúmulo sanguíneo, sem corpos estranhos e sem limo (LUTZ, 2008).

3.4.1.2 pH

Para Mesquita (2014, p. 103) a carne *in natura* é bastante susceptível a alterações de ordens bioquímicas provocadas por enzimas hidrolíticas endógenas e ação bacteriana.

A degradação dos macronutrientes e produção de metabólitos a partir da ação bacteriana provoca alteração na composição físico-química da carne, e uma das maneiras de se avaliar o estado dos alimentos é pela aferição de pH, os valores de 5,5 e 6,4 são considerados aptos para consumo e entre 6,0 e 6,4, a carne deve ser consumida imediatamente, conforme descrito no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), 1952.

A aferição de pH é feita a partir dos cortes da amostra em pedaços pequenos até totalizar 10 gramas, que serão depositados dentro de um recipiente, onde serão encobertos com água destilada e homogeneizados. Após a homogeneização, um pHmetro é imerso na amostra e fornecerá o resultado (FOTO 26).

FOTO 25. Avaliação do pH da carne
(Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.1.3 Reação de Éber para H_2S

É utilizada para avaliar o estado de conservação, porém só é realizada caso o pH da carne esteja indicado para consumo imediato pois é uma avaliação qualitativa. Fundamenta-se na combinação do gás sulfídrico com solução de acetato de chumbo, causando enegrecimento do filtro. O procedimento se dá pela transferência de 10 gramas da amostra e 20mL de água em um erlenmeyer que será fechado com 2 papeis filtro presos com um elástico. O frasco é colocado em banho-maria (FOTO 27), sendo aquecido durante 10 minutos. O H2S combinado com

acetato de chumbo produz sulfeto de chumbo, revelando mancha preta espelhada em papel de filtro (FOTO 28).

FOTO 26. Amostra em banho maria para éber em H_2S (Fonte: Arquivo pessoal).

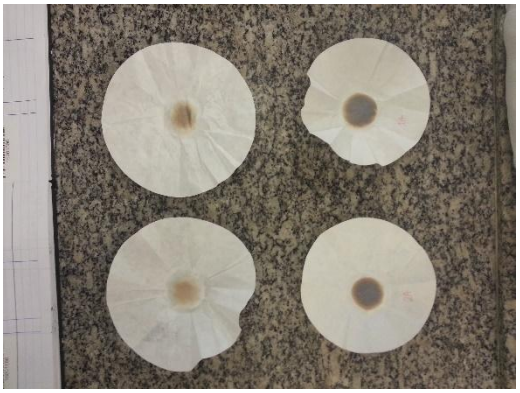

FOTO 27. Amostras negativas e positivas, respectivamente para reação de Éber em H_2S (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.1.4 Reação de Éber para amônia

Também usado para avaliar o estado de conservação de alimentos proteicos. A liberação de amônia indica início de degradação das proteínas indicando decomposição de aminoácidos sulfurados da carne, esta que ao reagir com ácido clorídrico, forma cloreto de amônio (NH_4Cl) visto como vapor branco.

O processo se dá pela transferência de 5mL do ácido clorídrico para um tubo de ensaio de 25mL, então fixa-se um pedaço da amostra na ponta de um arame introduzindo-o no tubo de ensaio (FOTO 29). Se houver condensação é um resultado positivo indicando degradação proteica.

FOTO 28. Amostra positivas para reação de Éber (NH_3). (Fonte: Andressa Schneider).

3.4.2 Análises físico químicas do leite

3.4.2.1 Acidez

A acidez é usada com objetivo de indicar o estado de conservação do leite, contaminação ou problemas de produção. Acidez pode indicar presença de processos fermentativos que ocorrem devido ao metabolismo microbiano.

Um pH alcalino pode indicar processos infecciosos como a mastite, também pode ser causada por resíduos químicos utilizados na higienização ou aguagem.

O procedimento dá-se pela transferência de 10mL da amostra para um béquer, logo adiciona-se de 4 a 5 gotas de solução de fenolftaleína e a titulação é feita com solução de hidróxido de sódio (NaOH) N/9 com uso de bureta de 10mL.

Assim gotas da solução de NaOH são instiladas na amostra sob agitação, o ponto de viragem, momento no qual o pH da amostra atinge a neutralidade (FOTO 30). Para cada 0,1mL da solução de titulação utilizada corresponde um grau Dornic, de modo que esta solução consegue neutralizar a acidez proveniente do ácido lático do leite na proporção de 1:1, logo corresponde à 0,1mg de ácido lático. Segundo a Instrução Normativa (IN) n° 62/2011, a acidez para leite cru é entre 14 e 18 graus Dornic.

Para leite materno, a regulamentação é feita pela ANVISA através de Resoluções de Diretoria Colegiada n° 171/2006, que preconiza acidez inferior ou igual à 8. O procedimento se dá pela adição de 8mL de água destilada em um recipiente plástico descartável com 2mL da amostra. A avaliação é colorimétrica, onde cada gota da solução de NaOH para titulação representa 2,5 graus Dornic (FOTO 31).

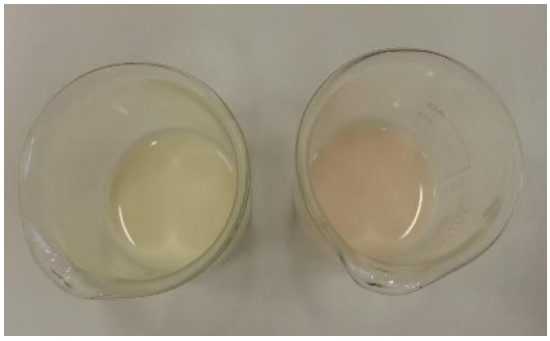

FOTO 29. Acidez Dornic (Fonte: Arquivo pessoal)

FOTO 30. Acidez Dornic de leite materno (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.2.2 Densidade

A densidade é importante pois está relacionada ao teor de gordura presente no leite além de outros fatores. Pelo fato do leite ser uma emulsão, os seus componentes influem na densidade do produto, com a presença da gordura por ser menos densa do que o leite, logo reduz a densidade, e densidade maior pode indicar menor teor de gordura.

A determinação é feita transferindo-se para uma proveta a amostra, a qual deve ser lida em temperatura de 15°C ou corrigida, colocando-se o termolactodensímetro lentamente na proveta e ser rotacionado. A leitura é feita após o equipamento estabilizar ao nível do menisco (FOTO 32).

Segundo a IN 62/2011, a densidade relativa para leite pasteurizado integral é de 1,028 a 1,034 g/ml.

FOTO 31. Densidade relativa do leite
(Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.2.3 Crioscopia eletrônica

A crioscopia é uma análise de precisão com objetivo de mensurar o ponto de congelamento exato do leite. O ponto de congelamento está relacionado com a proporção de moléculas que influenciam na osmolaridade da solução com o seu soluto. É um método empregado com o objetivo de detecção de fraudes. A análise é feita pelo crioscópio (FOTO 33) que precisava ser calibrado com soluções antes do seu uso (FOTO 34).

O índice estipulado pela legislação determina que valores aceitáveis compreendem entre -0,530° a -0,550° Hortvet ou -0,512° a 0,531° Celsius. Valores mais próximos de 0° indicam possível aguagem do leite ou leite mastítico e valores abaixo dos limites podem indicar adição de substâncias reconstituintes de crioscopia.

Recomenda-se que o valor da amostra fosse dado após média aritmética de três medições, porém somente uma era realizada.

FOTO 32. Crioscópio (Fonte: Arquivo pessoal).

FOTO 33. Soluções para calibração do crioscópio (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.2.4 Estabilidade ao etanol à 68%

Essa análise é realizada com o objetivo de avaliar a estabilidade da caseína em temperaturas elevadas como na pasteurização. Se houver coagulação pode ser devido a elevada acidez ou desequilíbrio salino decorrente da degradação do produto por ação bacteriana.

O procedimento se dá pela adição da solução de alizarol a 68% no leite, numa proporção de 1:1. A avaliação do resultado é feita mediante observação, o leite instável formará grumos e irá adquirir a coloração amarela, o leite estável não sofre alteração de cor e não se formam grumos (FOTO 35).

É um teste realizado antes de coleta do leite ainda na propriedade ou feito nos caminhões tanque na plataforma de recepção.

FOTO 34. Estabilidade da caseína ao alizarol 68° (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.2.5 Extrato seco total por método indireto

A avaliação é feita com o auxílio do disco de Ackermann, o qual fornece o valor baseado no valor da densidade e da gordura. O disco interno, é onde estão os valores da densidade que devem ser alinhados ao valor da gordura, no disco externo, então uma seta no disco interno irá apontar o valor de extrato seco total (FOTO 36). É uma análise ainda praticada no laboratório porém o seu uso não é mais permitido, de agora em diante deve ser praticado o método gravimétrico. O valor também pode ser dado pela fórmula.

$$\% \text{ Extrato seco} = 1{,}2 \cdot \% \text{ gordura} + \frac{2{,}665(100D - 100)}{}$$

Onde:

D

D refere-se à densidade.

FOTO 35. Disco de Ackermann (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.2.6 Peróxido de hidrogênio

A água oxigenada é um componente que não pode ser empregado no leite pois é um agente antimicrobiano que é usado com o objetivo de mascarar produtos com alta contagem microbiana.

O procedimento é feito transferindo-se 10mL da amostra para um tubo de ensaio, em seguida adiciona-se 2mL de solução de guaiacol 1% e 2mL de leite cru. A presença de peróxido de hidrogênio é denunciada pela coloração salmão (FOTO 37). Segundo BRASIL, 2014a, o peróxido de hidrogênio, oxidando o indicador a tetraguaiacol, responsável pela coloração característica.

FOTO 36. Amostra positiva para peróxido (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.2.7 Formaldeído

O formol é um composto antimicrobiano que é usado com o objetivo de conservação de matéria-prima. (TRONCO, 2008). Nesta técnica, é feito o uso do floroglucina, o formol na presença deste reagente produz um derivado hidroximetilado alterando a coloração para salmão.

O procedimento se dá pela adição de 2mL de ácido sulfúrico à 50% em 10mL de leite e 2mL de hidróxido de sódio a 10%.

3.4.2.8 Atividade de Peroxidase

A peroxidase é uma enzima natural do leite cru sendo altamente resistente à altas temperaturas, sendo um método importante para avaliar se o leite passou por algum processo térmico prévio à pasteurização e, para avaliar se a temperatura do pasteurizador está adequada ao processo tecnológico.

O procedimento dá-se pela transferência de 1mL de leite para um tubo de ensaio, então é aquecido à 45°C por 5 minutos, então adiciona-se 2mL de guaiacol a 1% e 3 gotas de peróxido de hidrogênio, aguarda-se por 30 segundos e, observa-se a coloração. Se formar a cor salmão, é um resultado positivo, a inalteração de cor é um negativo.

3.4.2.9 Atividade da Fosfatase

É uma enzima termosensível que estará presente em leite cru, sendo que a sua destruição pelo calor está relacionada ao tempo e temperatura, sendo inativada em condições de pasteurização, logo, é usada como controle de processo.

Para processar, é necessário pipetar 2mL de leite em um tubo e adiciona-se 1mL do reagente fenil fosfato dissódico. A formação de cor amarela é um resultado positivo, a inalteração de cor é negativo (FOTO 38).

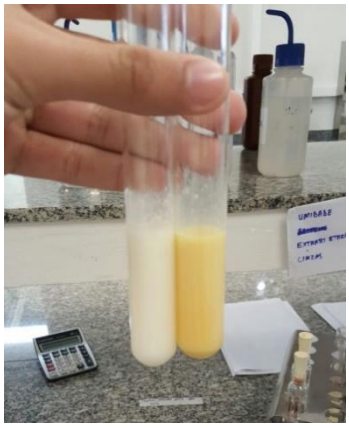

FOTO 37. Tubo negativo e positivo para atividade de fosfatase, respectivamente (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.2.10 Cloretos

As vezes são presentes como resíduos de produtos químicos utilizados durante a higienização de utensílios ou usados intencionalmente com o objetivo de recompor a crioscopia normal. A atividade enzimática é feita mediante a adição do substrato específico da enzima, em condições ideais para sua atuação.

O teste é feito colocando-se 5mL de leite em um tubo de ensaio com 0,5mL de iodeto de potássio a 7,5% e avaliar a coloração. A coloração amarela é um resultado positivo, inalteração da cor é negativo, onde, conforme descrito em BRASIL, 2014b, o fenol liberado reage com 2,6-dicloroquina cloroimida na presença de sulfato de cobre gerando um indofenol de cor azul.

3.4.2.11 Gordura (butirômetro de Gerber)

O processo dá-se pela transferência de 10mL de ácido sulfúrico para um butirômetro, adicionando-se 11mL da amostra e 1mL de álcool isoamílico, sendo tampado com a rolha, a seguir é feita a centrifugação à 1200 rpm por 5 minutos.

Após ajustar a rolha para que todo a parte de gordura esteja presente na escala, o valor numérico representa a porcentagem de gordura da amostra (FOTO 39).

FOTO 38. Teor de gordura por butirômetro de Gerber (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.2.12 Crematócrito

Análise realizada em leite materno, com o objetivo de determinar a proporção de gordura, creme e índice calórico de uma amostra. A mensuração destas partes é fundamental pois “o leite humano é o único alimento energético, nutricional e imunológico consumido em quantidades suficientes pelos recém-nascidos. ” (SILVA *et al.,* 2007), sendo fundamental no desenvolvimento fisiológico durante este período de consolidação do organismo.

O órgão que regulamenta a atividade de manipulação de banco de leite humano é a ANVISA, através da RDC n°171/2006, a qual regulamenta normas de funcionamento do banco de leite, estrutura física e quanto a seu uso. Não há padrão normatizado para os valores de seus constituintes, porém estes devem ser mensurados e descritos nos rótulos da embalagem onde estão acondicionados.

O processo se dá pela recepção duas vezes por semana de amostras coletadas no hospital da UNESP Botucatu, onde as amostras chegam em recipiente isotérmico, em tubos Falcon devidamente identificadas.

Com um tubo capilar, coleta-se no mínimo 2/3 do capilar com amostra, então uma das extremidades é selada por calor, sendo acondicionadas em uma centrífuga de hematócrito. A centrifugação é feita por 6 minutos para separação das partes de gordura, creme e soro.

O resultado da análise é feito pela mensuração das partes com auxílio de uma régua, assim as medidas são comparadas a valores tabelados que são previamente calculados no laboratório com o objetivo de reduzir o tempo gasto na análise.

Conforme a proporção de cada parte tem-se os valores de gordura, creme e calorias (FOTO 40). O valor energético também pode ser calculado pelas fórmulas abaixo:

Leite cru: (kcal/dl) = 5,99 x crematócrito (%) + 32,5

Leite congelado: (kcal/dl) = 6,20 x crematócrito (%) + 35,1

FOTO 39. Mensuração dos constituintes do leite materno em capilar (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.3 Análises físico-químicas do mel

3.4.3.1 Acidez

Este método é realizado com o objetivo de neutralizar a solução ácida do mel, diante do uso de solução de hidróxido de sódio a 0,1%, titulando até o pH 8,3.

O procedimento é realizado em duplicata, onde pesa-se 10g da amostra em um Becker sendo diluído em 20mL de água destilada então é adicionada em pequenas frações com o auxílio de pipeta volumétrica a solução de NaOH 0,1N sob agitação até o momento em que, com um phmetro, o pH atinja o valor de 8,3 (FOTO 41 e 42). O resultado é dado pela fórmula:

$$\text{Acidez em m.e.q/Kg} = V \times f \times 10$$

Onde:

V é o volume de solução titulante gasto na titulação (ml);

f é o fator de correção da solução titulante.

Segundo a IN 11/2000, o valor máximo de referência é de 50 mil equivalentes por quilo.

FOTO 40. Titulação de acidez do mel (Fonte: Arquivo pessoal)

FOTO 41. Mensuração do volume utilizado de solução de titulação (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.3.2 Prova de Lund

É realizada com o objetivo de avaliar a presença de albuminóides que são componentes presentes no mel, os quais ao entrarem em contato com a solução ácida precipitam, por (Mendes, *et al.*, 2009).

A prova é realizada a partir da pesagem de 2g da amostra em um tubo Falcon, homogemeizada com 20mL de água, adiciona-se 5mL de ácido tânico 0,5%, completa-se o volume do frasco até 40mL, deixar armazenado por 24 horas (FOTO 43). Segundo (BRASIL, 2014 c) na presença de mel puro, haverá formação de um precipitado no fundo do frasco que deve preencher entre 0,6 a 3,0mL (FOTO 44). Mel adulterado pode não haver formação de precipitado ou a quantia de precipitado é maior do que o intervalo permite.

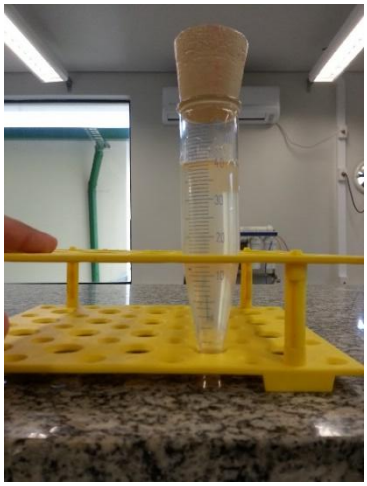

FOTO 42. Tubo de prova de Lund antes da precipitação (Fonte: Arquivo pessoal)

FOTO 43. Leitura da prova de Lund após 24 horas com precipitado (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.3.3 Prova de Fiehe

É o procedimento analítico o qual é feito com o objetivo de indicar a presença de substância que são produzidas por superaquecimento ou adição de xaropes de açúcar, os quais aumentam os níveis de HMF, por exemplo.

O processo se dá pela pesagem de 5 gramas da amostra em um béquer, adicionando-se 5mL de éter e promovendo agitação vigorosa, logo transfere-se a proporção etérea para um tubo de ensaio adicionando-se 0,5mL de solução clorídrica de resorcina e deixando em repouso por 10 minutos (FOTO 45). Na presença de glicose ou mel superaquecido, aparecerá coloração vermelha intensa, indicando fraude.

FOTO 44. Resultado negativo para prova de Fiehe (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.3.4 Prova de diastase

A atividade diastásica do mel está intimamente ligada a origem do produto. O processo se dá pela pesagem de 10 gramas de mel em um béquer e a adição de 20mL de água destilada, então passa-se 10mL da solução para dois tubos de ensaio, adicionando-se 1mL de solução de amido em cada um, sendo que um tubo permanecerá em temperatura ambiente e o outro estará em banho-maria a 42-45°C por uma hora. Após uma hora, coloca-se 1mL de solução de iodo.

O mel puro vai adquirir a coloração verde a castanho (FOTO 49) pois o amido foi degradado pela ação da diastase. Mel fraudado terá coloração azul ou violeta devido a quantia reduzida ou ausente da diástase o qual não irá inferir seu papel enzimático sobre o amido.

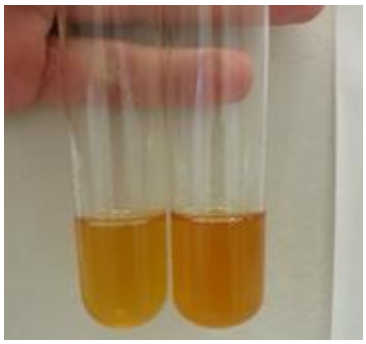

FOTO 45. Tubos com amostras positivas para diastase (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.3.5 Determinação de hidroximetilfurfural (HMF)

O hidroximetilfurfural é um aldeído gerado a partir da degradação do mel, indicando envelhecimento do produto ou alteração de suas propriedades físico-químicas, como a adição de açúcar invertido, ácidos e aquecimento do mesmo" (SILVA *et al.,* 2008). Também é comumente correlacionado a atividade tóxica que pode vir a ser prejudicial à saúde do consumidor, tendo em vista este risco, o MAPA regulamentou os parâmetros físico-químicos para estar apto para consumo na Instrução Normativa n° 11/2000, onde a quantia máxima permitida é de 60mg/kg.

É necessário pesar 5 gramas da amostra em um béquer de 50 ml, transferindo-se com 20mL de água destilada para um balão volumétrico de 50mL. Então deve-se adicionar 0,5mL de solução de Carrez I e homogeneizar, seguido de 0,5mL da solução de Carrez II, homogeneizando. Então deve-se filtrar a solução

com o auxílio de um papel-filtro descartável em um béquer, descantando-se os primeiros 10mL do filtrado. Em seguida pipeta-se 5mL de cada amostra para tubos de ensaio, adicionando 5mL de água nos tubos e 5mL da solução de bissulfito de sódio à 0,2%, sendo que é necessário um tubo “branco” de água destilada e bissulfito de sódio para cada amostra.

O resultado é feito pela absorbância da amostra comparada com seu tubo “branco” à comprimento de ondas de 284nm e 336nm em cubetas de 1cm de quartzo. Os valores de leitura serão aplicados na formula abaixo:

$$\text{HMF mg/kg} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149{,}7 \times 5}{P}$$

Onde:

A_{284} = leitura da absorbância a 284 nanômetros;

A_{336} = leitura da absorbância a 336 nanômetros;

P = massa da amostra em gramas;

5 = massa nominal da amostra;

149,7 = (126/16830) x (1000/10) x (1000/5).

3.4.3.6 Umidade por refratometria

É usado o método de Chataway, onde usa-se a medida de índice de refração da amostra para ser convertida em porcentagem de umidade.

Deve-se colocar 3 gotas da amostra para o prisma do refratômetro fazendo a leitura da refração (FOTO 47). O resultado é dado após o ajuste da temperatura de leitura que influencia diretamente no resultado da leitura. Para cada grau fora dos 20°C padronizados pela tabela, deve adicionar 0,00023 para cada grau acima de 20°C, e subtrai-se 0,00023 para cada grau abaixo de 20°C. O resultado é dado por valores tabelados que foram previamente calculados pela equipe do laboratório.

FOTO 46. Refratrômetro de Abbé (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.4 Análise físico-química de óleos e gorduras

A análise físico-química de óleos e gorduras tem por objetivo avaliar a qualidade e a vida útil deste. Para tal, a avaliação de peróxidos e rancidez é importante, uma vez que, conforme o uso ou com o passar do tempo, formam-se peróxidos que o produto foi elevado a temperaturas elevadas sucessivas vezes.

3.4.4.1 Rancidez

Pesar 2 gramas da amostra em um Becker e adicionar 2mL de ácido clorídrico, agitar por 30 segundos para homogeneização, deixar a solução parada por 10 minutos para que haja a separação das fases (FOTO 48). Resultados positivos formam uma fase superior de coloração vermelha, a ausência deste é um resultado negativo.

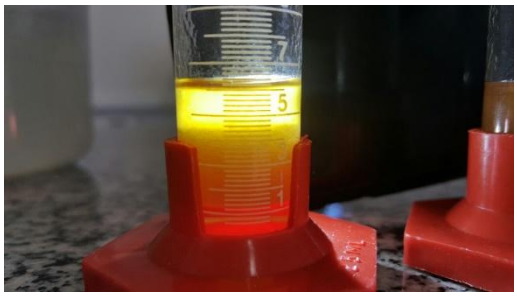

FOTO 47. Prova de rancidez negativa (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.4.2 Quantificação de peróxidos

Confome (BRASIL, 2014d), pesa-se 5 gramas da amostra em um Erlenmeyer, e dentro de uma capela, adiciona-se 30mL de clorofórmio, agita-se até a dissolução completa. Adiciona-se 0,5mL de iodeto de potássio, a mistura vai ficar amarelada, armazena-se em um local escuro por 1 minuto na ausência de luz.

Adiciona-se 30mL de água destilada lavando toda a superfície da vidraria, inclusive a tampa. Inicia-se a titulação com solução de tiossulfato de sódio 0,01N que deve ser feita em até 5 minutos, a cor de viragem é amarelo-pardo. Adiciona-se 0,5mL de solução de amido a 1%. Espera-se a coloração azul e continuar a titulação até que a amostra fique incolor. Entretanto, como a amostra era de óleo de aves, que naturalmente possui a coloração amarelo-escuro, é difícil avaliar o ponto de viragem.

O resultado é dado pela fórmula (BRASIL, 2014d):

Índice de peróxidos mEq/kg= (V-B).C.f.1000/m, onde:

V = volume (ml) de tiossulfato de sódio gasto na titulação da amostra;

B = volume da solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação do branco, em ml;

C = Concentração da solução de tiossulfato de sódio;

f = fator de correção da solução de tiossulfato de sódio;

m = massa da amostra, em gramas, ou massa da amostra na alíquota.

3.4.5 Análise de Água

3.4.5.1 Avaliação Sensorial

A água ao chegar para análise deve ser homogeneizada invertendo o frasco repetidas vezes. Em seguida, uma alíquota deve ser transferida para um béquer, no qual seja possível observar o aspecto da água que deve ser límpida, incolor e inodora. Odor de cloro, musgo, coloração marrom-esverdeada ou presença de partículas sólidas não são aceitáveis.

3.4.5.2 pH

A análise é feita com uso de um phmetro portátil. Para avaliação do pH a amostra deve ser colocada em um béquer em volume suficiente para que o diafragma do phmetro fique submerso, o resultado é dado após 5 minutos de leitura em repouso, não podendo ultrapassar 10 minutos. Segundo a portaria 2914/2011 o pH aceitável está entre o intervalo de 6,0 a 9,5.

3.4.5.3 Avaliação da presença de nitrogênio amoniacal

Em (Lutz, 2008) avaliação do nitrogênio na água é fundamental, os compostos nítricos como amônia (NH_3) são essenciais a permanência de micro-organismos em quaisquer que sejam os meios, na água a sua presença é normal,

principalmente quando fala-se a respeito de água de poços-artesianos, porém, valores muito altos podem indicar risco à saúde.

O teste é feito transferindo-se 50 ml da amostra para uma bureta, adicionando-se 1mL de tartarato duplo de sódio e potássio e 2mL de solução de Neslller. A bureta deve ser fechada e agitada repetidas vezes para homogeneizar a solução. A avaliação do resultado é colorimétrica, onde a cor amarela indica intensa presença de nitrogênio amoniacal e a não alteração de cor indica baixos níveis de nitrogênio amoniacal.

3.4.5.4 Dureza

A dureza da água refere-se à concentração de cátions multivalentes presentes em solução na água, sendo o cálcio (Ca) e magnésio (Ca^{+2}, Mg^{+2}) e, em menor escala ferro, manganês, estrôncio e alumínio. A natureza da dureza pode ser natural (proveniente de dissolução de rocha calcárias, ricas em cálcio e magnésio) ou antropogênica (despejo de efluentes industriais). Corriqueiramente, a água com maior dureza reduz a formação de espuma e, se aquecida, aumenta a taxa de precipitação dos sais em tubulações. Ao contrário, águas com baixa dureza, a microbiota é menos resistente a presença de substâncias tóxicas (FUNASA, 2006).

A análise é realizada, vertendo-se 100mL da amostra em um Erlenmeyer de 250mL, adicionando-se 2mL de solução tampão para dureza e uma pequena quantia de negro de eritocromo T não exata. A solução adquire coloração rósea e para determinar a dureza, usa-se da titulação com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,01N, que é transferida para uma bureta sendo gotejada no erlenmeyer sob agitação até atingir o ponto de viragem onde há formação de coloração roxa tendendo ao azul. O resultado é dado pela fórmula (LUTZ, 2008):

$$MgCaCO_3/L = \frac{V \times fc\ (EDTA) \times 1000}{Z}$$

Onde:

V é o volume de EDTA usado;

fc é o fato de correção da solução de titulação;

Z é o volume da amostra.

3.4.5.5 Cloro residual livre (CRL) por refração

O cloro é um composto químico adicionado a água durante a fase de tratamento, com o objetivo de eliminar grande parte da carga microbiológica presente, entretanto, esta pode ser não efetiva caso haja contaminação da água por matéria orgânica o que compromete a eficácia do tratamento.

A análise é feita mediante método refratométrico em duplicata com solução “branca” que possui apenas o reagente e não a amostra. Usou-se 100mL da amostra em uma proveta adicionando-se 5mL de solução de orto-toluidina seguido da homogeneização. A leitura é feita com a absorbância em 465nm. O resultado é dado pela fórmula:

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

Onde:

A refere-se ao valor obtido na leitura de absorbância.

3.4.6 Análise Bromatológica

A análise bromatológica compreende por ser composta de métodos físico-químicos que são empregados com o objetivo de determinar a quantidade das substâncias presentes nos alimentos, como carboidratos, proteínas, lipídios, umidade e resíduos minerais fixos ou cinzas. Em determinados momentos, a sua utilização torna-se decisiva para equacionar e resolver problemas de saúde pública e também para definir e complementar ações de vigilância sanitária (LUTZ, 2008).

No SOAP, foi enviado para análise 30 itens componentes de cesta básica, sendo que eram arroz, feijão, farinha de trigo, fubá, sal, sal temperado, bala, gelatinas, bolacha, biscoito, refresco em pó, macarrão, extrato de tomate, mistura para bolo, dentre outros.

A seleção de cada análise dependia da composição a qual o produto tinha em sua tabela nutricional. Os componentes os quais as quantidades eram nulas não foi necessário que a análise para aquele componente fosse realizada.

3.4.6.1 Cinzas

Pode também ser denominada de resíduos por incineração ou resíduos minerais fixos. “São os produtos expostos a temperaturas de 550-570°C, sendo que

os seus resíduos são avaliados” (LUTZ, 2008). Todos os alimentos recebidos passaram por este método, em duplicata.

No dia anterior era necessário que se fizesse o processo de condicionamento dos cadinhos quais deveriam ser condicionados previamente em mufla a 550°C por 30 minutos e fossem armazenados em dessecador por 30 minutos para retirar toda a umidade (FOTO 49). No dia seguinte, pesaram-se 2 gramas da amostra, em duplicata, seguido de acondicionamento em mufla previamente aquecida a 550°C, onde permaneceriam por seis horas. Após seis horas, o cadinho com a amostra era pesado. O resultado era expresso pela fórmula (LUTZ, 2008):

$$\text{RMF (\%)} = \frac{(\text{peso final} - \text{peso do cadinho})}{\text{Peso de amostra}} \times 100$$

FOTO 48. Cinzas em dessecador
(Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.6.2 Umidade

A umidade seguia um processo semelhante as cinzas, também sendo análise realizada em todos os itens. Ao dia anterior da análise os cadinhos eram acondicionados em estufas a 105°C por 30 minutos e acondicionados em dessecadores para retirar toda a umidade. No dia das análises, os cadinhos eram pesados previamente a pesagem da amostra pois o resultado final era dado por diferença de peso. Pesava-se 5 gramas de amostra em duplicata, em seguida os cadinhos eram colocados em estufas a 105°C por 4 horas (FOTO 50). Em seguida os cadinhos eram pesados. O resultado era expresso pela fórmula (LUTZ, 2008):

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{[(\text{peso da amostra} + \text{peso do cadinho}) - \text{peso final}]}{} \times 100$$

Peso da amostra

FOTO 49. Amostras trituradas em dessecador para avaliação da umidade (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4.6.3 Proteína

A análise de proteína foi aplicada somente aos produtos que exibiam valor proteico em suas embalagens. Pesou-se 0,4 gramas da amostra em duplicata em um papel permeável, em seguida foram embrulhadas e acondicionadas em tubos de Kjeldahl e após isso, adiciona-se uma pequena quantidade de solução catalítica para acelerar a velocidade da reação e 5mL de ácido sulfúrico, em seguida os tubos com as amostras eram acondicionados dentro de uma capela com digestores, os quais eram responsáveis por aquecer a amostra até 400°C por 4 horas. Após isso as amostras eram resfriadas a adicionadas de água. Em paralelo, adiciona-se 10mL de ácido sulfúrico em um erlenmeyer com 4 gotas de vermelho de metila, para o processo de destilação que perdurava 5 minutos (FOTO 51). As amostras, após terem sido destiladas, são tituladas com solução de NaOH a 0,1N até o ponto de viragem de solução rosa para amarelo. O resultado é dado pela fórmula (LUTZ, 2008):

$$\text{Volume} = (\text{volume de ácido} \times FC) - (\text{Volume de base} \times FC)$$

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{\text{Volume} \times 0{,}14 \times \alpha}{\text{Peso da amostra}}$$

Sendo: α – fator de correção para a amostra, que pode ser: 6,25 para carnes, 6,38 para lácteos e 5,74 para vegetais.

FOTO 50. Amostra em destilação de proteína. (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.6.4 Extrato Etéreo

O extrato etéreo é o modo de se determinar o teor de gordura de alimentos que possuem maior dificuldade em extrair-se os lipídios.

Pesa-se em papel filtro de celulose 2 gramas em duplicata da amostra, Os filtros são acoplados no Soxhlet, equipamento responsável pela extração de lipídios, são acondicionados os copos de Soxhlet que ficam abaixo dos filtros, que serão adicionados com 80mL de éter etílico aquecidos a 90°C por 6 horas para que este evapore e “lave” a amostra. A solução de éter solubiliza os lipídios que ficam retidos ao fundo dos copos de Soxhlet. Após as 6 horas, os copos de Soxhlet com o extrato etéreo são acondicionados em dessecadores por 30 minutos e pesados em seguida. O resultado foi dado pela fórmula (LUTZ, 2008):

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{(\text{peso final} - \text{peso do copo})}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

FOTO 51. Amostras em avaliação de extrato etéreo em Soxhlet (Fonte: Arquivo pessoal)

3.4.6.5 Avaliação de cloreto de sódio

O cloreto de sódio, é o principal sal presente nos alimentos, sendo que as amostras de sal e sal temperado passaram por esta análise.

A partir das amostras de cinzas, inicia-se a análise para NaCl. Aos cadinhos são adicionados de 2 gotas de ácido nítrico 1+9 e homogeneizadas com bastão de vidro. O cadinho com as cinzas e o bastão de vidro são lavados com água destilada aquecida, até que o lavado completar 300mL que devem ser transferidos para um Erlenmeyer, adicionar uma colher de carbonato de cálcio que tem função de indicador e ser resfriada. Então adiciona-se 1mL de cromato de potássio à 5% e ser titulado com nitrato de prata a 0,1N até que a solução adquira a coloração vermelho-tijolo. O resultado é dado pela fórmula (LUTZ, 2008):

$$\text{NaCl (\%)} = \frac{\text{Volume da solução de titulação} \times \alpha \times 0{,}585}{\text{Peso da amostra}}$$

4 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO DA CVALE

A Cooperativa Agroindustrial Cvale de sede no município de Palotina, Paraná, tem atuação no estado do Paraná e em outros quatro estados também no Paraguai. Sendo uma empresa produtora de soja, milho, trigo, mandioca, leite, frango e suínos, e atua na prestação de serviços. Neste mesmo segmento, a cooperativa mantém um complexo avícola com capacidade de abate de 600 mil frangos/dia, situado no município de Palotina, que abastece a maioria dos estados brasileiros e ainda exporta para mais de 70 países (FOTO 53). (Cvale, 2016).

O abatedouro de aves possui capacidade de produzir 150 diferentes tipos de cortes que são comercializados no mercado interno e, também, são exportados para países da Ásia e Oriente Médio que possuem exigências específicas quanto a qualidade dos produtos os quais irão adquirir, assim sendo, em dezembro de 1950 foi promulgada a Lei n° 1283 a qual determina em seu artigo primeiro que “É estabelecida a obrigatoriedade da prévia fiscalização, sob o ponto de vista industrial e sanitário, de todos dos produtos de origem animal, comestíveis e não comestíveis, sejam ou não adicionados de produtos vegetais, preparados, transformados, manipulados, recebidos, acondicionados, depositados e em trânsito”.

Sob o número de 3300 o Serviço de Inspeção Federal da Cvale possui dois médicos veterinários oficiais concursados e um agente de inspeção que estão

lotados permanentemente no estabelecimento. Estes são responsáveis por fiscalizar as condições higiênico-sanitárias das instalações e equipamentos garantindo a qualidade do produto final. As atividades de abate são divididas em 3 turno, sendo dois turnos de 8 horas onde o abatedouro tem suas atividades normais e um turno de 6 horas para a higienização e desinfecção das instalações e equipamentos.

Foto 52. Vista aérea do abatedouro de aves da Cvale. Fonte (http://www.cvale.com.br/)

5 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante as 250 horas de estágio, foi acompanhado as atividades de rotina dos auxiliares do SIF através do monitoramento dos Procedimentos Sanitários das Operações (PSO), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Estes processos também eram avaliados pela equipe de Controle de Qualidade do abatedouro, o qual era fiscalizado visualmente e registrado através do preenchimento de planilhas, onde foi supervisionado pelo Médico Veterinário Oficial César Plínio Mantuano Barradas, responsável pelo Serviço de Inspeção Federal na planta de abate da Cvale sob registro n°3300.

O abate de aves está regulamentado pela Portaria n° 210/1998, que dispõe sobre o Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves, havendo instruções complementares como: IN 89/2003 Regulamento técnico de aves temperadas; IN 17/2006 Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Prevenção e Controle da Doença de New Castle; IN 22/2005 Regulamento Técnico para rotulagem de produtos de origem animal embalados.

O abatedouro tem, no seu plano de inspeção, estabelecidos alguns elementos de inspeção os quais são necessários para que as condições higiênico-

sanitárias sejam mantidas, para isso os Procedimentos Sanitários das Operações (PSO) foram implementados para que os pontos de interesse dentro da planta sejam observados, entre eles também são consideradas as instalações e equipamentos, vestiários, sanitários, barreiras sanitárias, iluminação, ventilação, águas de abastecimento e residuais, controle de pragas, hábitos higiênicos dos funcionário através do BPF,

São várias questões a serem avaliadas numa área industrial muito grande, logo, a planta de processamento foi subdividida em áreas, sendo: A1 – galpão de espera, plataforma de recepção, seção de pendura e área de lavagem de gaiolas; A2 –seção de sangria, escaldagem, e depenagem; A4 – Seção de evisceração; A6 – Pré-resfriamento e embalagem; A8 – Seção de temperados, cortes e congelamento rápido individual (IQF); A12 – seção de expedição, paletização e embalagem secundária; A13 – Seção de CMS; A14 – Fábrica de gelo; A15 – Almoxarifado e A16 – Graxaria.

Cada área envolve riscos sanitários diferentes, estes são determinados através de operações que são correspondestes a riscos como: contaminação cruzada, contaminação de carcaças, remoção de penas, remoção de cutículas, deficiência de evisceração, deficiência da higienização de esteiras e temperatura. Todos estes elementos devem ser avaliados conforme a área na qual o plantonista está designado a inspecionar no dia.

No setor industrial, o programa de APPCC prevê quatro pontos críticos que requerem atenção, sendo o ponto 1Q, localizado na área de descarregamento de animais, ponto 2B localizado na evisceração, 3B na saída do túnel de congelamento e 4F no setor de expedição.

No SIF, são 5 plantonistas, onde um está permanentemente lotado na área 1 de espera, recepção e seção de pendura, outros 3 plantonistas estão entre as áreas 2 até a 12 de cada linha, sendo que um plantonista está designado para as áreas de inspeção de cada linha de abate, e o quinto plantonista está fixo na expedição de produtos. As atividades acompanhadas estão descritas nos itens abaixo.

5.1 Inspeção pré-operacional

Rotineiramente, às 3 horas da manhã, os auxiliares de inspeção percorreram todas as salas que compunham a linha de abate para avaliar as condições de higienização dos equipamentos, se estes estavam de acordo com as normas estabelecidas pelo Procedimento Padrão de Higiene Pré-operacional (PPHO), que determinava o modo como deve ser feita a higienização, temperatura da água usada, qual os produtos utilizados, diluições e tempo de espera para ação do sanitizante. Este procedimento repetiu-se diariamente, onde a inspeção visual foi realizada onde um equipamento da linha de abate, de toda a linha, foi selecionado para avaliação visual da qualidade da higienização e assim liberar o setor para a entrada de funcionário de abate.

5.2 Inspeção pré-abate

Baseada na avaliação documental quanto a guia de trânsito animal, boletim sanitário, ficha de acompanhamento do lote e nota fiscal do produtor. A avaliação do tempo de carência das medicações utilizadas e avaliação do porcentual de mortalidade eram os itens observados pelos auxiliares de inspeção. Durante o período de estágio apenas um lote chegou ao abatedouro com mortalidade superior a 10% num período menor de 24 horas, a causa foi estabelecida por hipertermia e o lote foi liberado para abate. Também é onde está o PCC 1Q, ponto no qual a verificação documental do período de carência é feita, o atendimento do período de carência é essencial para o abate do lote pare que os produtos não possuam resíduos metabólicos da medicação, este deve ser informado ao plantonista responsável pela linha de abate deste lote em específico, o lote analisado será registrado em planilha e enviado ao serviço médico veterinário oficial.

5.3 Inspeção *ante-mortem*

A inspeção *ante-mortem* “compreende-se por exame visual dos lotes de aves destinados ao abate, avaliação documental da guia de trânsito animal, ficha de acompanhamento do lote, boletim sanitário e nota fiscal do produtor.” (BRASIL, 1998) que tem por objetivo evitar o abate de aves com repleção gastrointestinal, evitar abate em conjunto de aves que justifiquem abate de emergência, detectar doenças que não podem ser vistas no exame *post-mortem* tal qual New Castle e identificar lotes que necessitem de redução da velocidade de abate.

É de muita importância avaliar o período de carência das medicações utilizadas na fase de produção no lote. Nessa etapa a avaliação visual dos animais do lote pode ser feita de modo amostral onde uma pessoa treinada avalia os animais em uma caixa do primeiro caminhão do lote para avaliação.

5.4 Insensibilização, sangria, escaldagem e depenagem

São etapas fundamentais no abate e também são alvos do plano de inspeção. Durante o estágio estas áreas e sua respectiva operação eram monitoradas pontualmente, uma vez por turno, através da verificação oficial dos elementos de inspeção, nos quais os seus elementos de inspeção: manutenção das instalações e equipamentos, barreiras sanitárias, iluminação, ventilação, água de abastecimento e residual, controle de pragas, limpeza e sanitização (PPHO), hábitos higiênicos (BPF) e temperaturas eram avaliados, e um equipamento sempre fora selecionado da modo aleatório para avaliar se o PSO estava sendo mantido. Se alguma não conformidade fosse percebida esta era comunicada ao operador responsável pelo setor e solicitado reparo, caso o problema prejudicasse a qualidade do processamento, a linha seria interrompida.

5.5 Evisceração

A etapa de evisceração é onde encontra-se o início da área limpa, onde o serviço de inspeção feito pelos auxiliares divide-se em 3 linhas: 1, 2 e 3 e o Departamento de Inspeção Final (DIF), sendo que cada linha possui as linhas A, B e C. O serviço de monitoramento feito pelos plantonistas era feito avaliando-se o PCC 2B, o qual avaliava o risco biológico o qual aquela carcaça poderia estar oferecendo se estivesse contaminada por conteúdo gastrointestinal ou ração, o SIF deixa permanentemente 7 pessoas realizando a revisão destas carcaças. O plantonista realiza a verificação durante 1 a 2 minutos de possíveis traços de contaminação, o resultado era anotado em uma planilha onde marcava-se a porcentagem de carcaças contaminadas pelo número de carcaças que passaram durante o período acompanhado, houve apenas um episódio de verificação de carcaça contaminada por ração, a medida corretiva tomada foi aumentar o número de pessoas na revisão de carcaça.

5.6 Pré-resfriamento

É o início da fase de conservação da carne da ave que tem por objetivo reduzir a atividade enzimática e a ação bacteriana. Para isso, são utilizados tanques com água gelada que possuem pás rotatórias do tipo rosca sem fim (spinchiller). Estes tanques são denominados de Chiller, que são compostos por um pré-Chiller o qual deve ter temperatura máxima de 16°C, disponibilidade de 1,5L de água por ave e a água de renovação deve ter no máximo 4°C. Aos tanques intermediários a temperatura máxima deve ser 4°C e a disponibilidade de água de 1L por ave. A renovação de água é constante pelo sistema de contracorrente com o objetivo da água ao final do Chiller estar mais fria e menos contaminada. O equipamento deve ser esvaziado e higienizado a cada turno (8 horas).

Também é feito o controle do teor de cloro da água, segundo a legislação, a água utilizada pode conter até 5ppm de cloro, entretanto, a planta da Cvale exporta produto para países de união europeia, a qual aceita até 1ppm de cloro, assim os parâmetros de cloro estabelecido pela empresa, devem ser entre 0,25ppm e 1ppm. A avaliação do cloro é feita tanto da água utilizada no Chiller, quanto em pontos específicos que estão dentro da planta de abate.

O uso da tecnologia de Chiller gera um ônus, que corresponde pela absorção de água pela carcaça, a qual é uma característica esperada, porém possui limite de 8% de absorção. Uma vez por turno em cada linha, são marcadas e pesadas 10 carcaças que passarão pelo Chiller, de modo que ao final do pré-resfriamento, serão pesadas novamente, o resultado é dado pela subtração do peso final pelo peso inicial dividido pelo peso inicial multiplicado de 100, o resultado refere-se à quantidade de água absorvida pela carcaça, então é feita a média das 10 carcaças. A legislação permite até 8% de absorção média. Os resultados da absorção feitos pelo controle de qualidade da empresa são anotados na mesma ficha a qual o SIF faz para fins de comparação.

O controle do pH também é feito da água utilizada pela indústria, diariamente, são coletadas as águas dos Chiller e de um ponto de coleta de água aleatório, sendo que o pH aceitável está entre 6,0 e 9,5, a qual é aferida com uma fita que contêm escalas de cores determinadas para cada grau de pH.

5.7 Seção de Cortes ou Espostejamento

As carcaças após saírem do pré-resfriamento podem seguir para embalagem de carcaças inteiras ou para os cortes, a partir deste momento, os produtos devem ter temperatura de 7°C ou inferior de modo que a aferição seja feita diariamente de modo aleatório de um único tipo de corte (coxa, peito, sobrecoxa) de várias amostras, sendo feita também a avaliação da temperatura ambiental, que deve ser no máximo de 12°C. Nesta ambiente é onde ocorre uma das partes de maior manipulação, assim, era um dos pontos onde a atenção estava voltada, uma vez que, o manipulador é uma fonte de contaminação, logo as Boas Práticas de Fabricação deveriam estar implantadas. É notável esclarecer que por ser uma área que envolve maior manipulação a grande velocidade de abate e exigência da empresa. Também é necessário verificar o estado de limpeza das calhas residuais, sistema de autolimpeza das esteiras e equipamentos, disponibilidade das caixas de condenações, eficiência do sistema de vácuo para coleta de resíduos que serão destinados a CMS, escoamento de águas residuais presentes no piso, limpeza e sanitização das caixas plásticas e carrinhos, higienização e troca de utensílios (facas, tesouras, chairas, placas e luvas de aço, látex e nitrílicas), fluxo de produção e comportamento do funcionário. Produtos de pequena volumetria e que fossem embalados juntos seguiam para o sistema de resfriamento individual rápido (IQF), o qual congelava os cortes e os embalava em suas embalagens primárias. As embalagens após receberem a embalagem primária e irem para o resfriamento passam pelo PCC 3B, o qual verifica-se a temperatura do produto, temperatura do túnel de congelamento, integridade do rótulo, identificação de rótulo, número do rótulo, data de fabricação e validade.

5.8 Frigorificação

Etapa posterior aos cortes na qual os produtos recebem embalagem secundária ou terciária e ficam armazenadas em câmaras de resfriamento, as quais devem ser capazes de manter este produto de -12°C para produtos comercializados internamente e a -18°C para produtos exportados. Os produtos foram resfriados no túnel de resfriamento, também sendo um ponto verificado durante a inspeção, o seu monitoramento baseava-se unicamente em seu fluxo e na sua temperatura. As câmaras de resfriamento devem possui piso íntegro, sem acúmulo de águas residuais ou condensação, sem odores fortes, com todos os produtos

acondicionados em caixas de poliestireno brancas sobre pallets plásticos com seu produto identificado em temperaturas compatível com o resfriamento sob iluminação fria, a temperatura do produto deve estar -1 a 4°C, e ambiente entre -3 e 1°C o qual deve durar por volta de 12 horas e o seu produto válido por até 9 dias.

O congelamento é realizado pelo método de congelamento individual rápido (IQF), onde um freezer em espiral recebe os cortes via esteira pela sua base e o movimento os leva até a sua parte superior em 30 minutos, sendo capaz de congelar os produtos individualmente a temperaturas -20°C ou menos, porém a manutenção dos produtos em câmara de estoque é de -12°C para produtos comercializados internamente e -18°C para produtos exportados. A carne mecanicamente separada (CMS) é congelada em blocos em sistema de armário de placas e é embalado em embalagem primária plástica (BRASIL,1998).

As câmaras de estocagem devem manter entre -18° e -20°C e umidade relativa de 95%.

Também é o local onde é feita a avaliação da absorção, conhecido como "*drip-test*" ou teste de gotejamento, é o teste utilizado para avaliar o grau de absorção de água pela carcaça durante o processo de congelamento, o teste baseia-se na coleta de 10 carcaças congeladas e já embaladas, onde estas são desembaladas e pesadas, seguido da pesagem da embalagem. As carcaças serão acondicionadas em sacos plásticos e submergidas em água aquecida à 42°C por 1 hora, seguido do banho-maria, as carcaças são penduradas e secas para que toda a água residual escorra e sejam pesadas novamente. O resultado da absorção é dado pela diferença de peso inicial descontado do peso da embalagem e do peso final dividido pelo peso inicial, o valor máximo é de 6% (BRASIL, 1998).

5.9 Expedição

A expedição é onde é feita a verificação do PCC 4F, onde as embalagens secundárias passam através de detectores de metais, que avaliam a presença de: ferro, aço e alumínio, é um equipamento que tem acompanhamento constante e deve ser testado pela empresa de hora em hora e, diariamente, o plantonista do SIF faz a verificação pessoal do processo. Toda a verificação documental se os produtos que são expedidos correspondem ao que estão na nota fiscal, assim como sua quantidade. A temperatura também deve ser verificada antes de serem expedidas sendo que a temperatura máxima dos produtos permitida na expedição sejam de

2°C acima da temperatura mínima, se as temperaturas superarem o limite, o produto é sequestrado e resfriado até atingir o limiar ideal para ser expedicionada.

6. CONCLUSÃO

O médico veterinário tem ampla capacidade de auxiliar na implementação de seus conhecimentos na produção de alimentos, seja desde o início da cadeia produtiva até o momento de processamento industrial, de modo que ele deve conhecer as tecnologias implementadas, qual é o embasamento teórico dos processos e ter amplo conhecimento da legislação regulamentar. Também se vê que a sua participação no ambiente laboratorial em pesquisas microbiológicas e físico-químicas auxiliam na avaliação da qualidade dos produtos e na monitoração dos mesmos. Assim, médico veterinário pode ser considerado como uma das chaves fundamentais que garantem a qualidade dos alimentos de origem animal, sendo necessário na manutenção da segurança alimentar de modo que a fiscalização é uma atividade exclusiva.

Do ponto de vista pessoal, o estágio permitiu que fosse observado, na prática, qual a rotina de um médico veterinário, suas responsabilidades e dificuldades enfrentadas diariamente, tanto nos quesitos técnicos quanto no convívio social, sendo uma experiência de grande valia tanto para a formação como médico veterinário quanto para formação individual.

7 REFERÊNCIAS

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM ™. Manual de interpretação de Petrifilm para mesófilos, 2015.

AFONSO, J. A. B.; VIANNI, C. E.; Variação do teor de cloretos e acidez Dornic no leite de vacas com mastite induzida. Revista Universo Rural, Ciência da Vida, v. 17, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, junho de 1995.

ALABURDA, J.; NISHIHARA, L. Presença de compostos de nitrogênio. Revista de Saúde Pública, v. 32, n. 2, p. 531-537, Universidade de São Paulo, 1998.

BECKTON DICKENSON, INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO – MEIOS EM PLACAS PRONTOS A USAR, BD XLD Agar (Ágar de desoxicolato-lisina-xilose), Abril de 2013.

BECKTON DICKINSON™, Difco Manual, 2° edição. Acessado em: < https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/211363.pdf>, 21 de Agosto de 2016.

BECKTON DICKINSON™, INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO – MEIOS EM PLACAS PRONTOS A USAR, Acessado em: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PT-PA-254458.pdf, 21 de Agosto de 2016.

BENNETT, W. R., LANCETTE, G. A., Bacteriological Analithical Methods (BAM), cap. 12 *Staphylococcus aureus*, 1998.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Laboratório Nacional Agropecuário – Determinação do índice de peróxidos em produtos de origem animal por oxidimetria, 2014.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 210 - Regulamento Técnico de Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves (Instalações e equipamentos, Higiene, Inspeção *ante-mortem* e *post-mortem* e Critérios de julgamento), 1998.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 89 – RTIQ de Aves Temperadas, 2003.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 17 – Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e Prevenção e Controle da Doença de Newcastle, 2006.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 22 – Regulamento Técnico para rotulagem de produtos de origem animal embalados, 2005.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, Inspeção de carnes bovina, 1952.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS Laboratório de Produtos de Origem Animal. Pesquisa de Peróxido de Hidrogênio em Leite Fluido pelo Método de Guaiacol, 2014.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS Laboratório de Produtos de Origem Animal. Pesquisa de Fosfatase Alcalina em Leite Fluido por Colorimetria, 2014.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel, 2000.

BRASIL, MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Prova de Lund, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde, Fundação Nacional para Saúde (FUNASA). Programação e Projeto Físico de Unidade Móvel para Controle da Qualidade de Água. Brasília, 2009.

BRASIL, MS, Ministério da Saúde. Portaria 2914 - Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, 2011.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada n° 171 - Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano, 4 de setembro de 2006.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 12 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, 2001.

BRASIL. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°62 - Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, 2003.

CATARINA, Brasil, Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó. Epidemiologia e Serviço de Saúde, vol. 20, p.401-407, Brasília, Distrito Federal, 2011.

CDC, Center for Disease Control and Prevention, Acessado em: http://www.cdc.gov/salmonella/index.html, 18 de Agosto de 2016.

CVALE, Cooperativa Agroindustrial do Vale, Complexo Avícola. Disponível em: http://www.cvale.com.br/complexo_avicola.html. Acessado em 27 de setembro de 2016.

DIAS, J. da S.; CAMARGO, A. C. de; BARIN, C. S.; ELLENSOHN, R. M. Caracterização físico-química de amostras e mel. Ciências Exatas de Tecnologia, Londrina, v.8, n.1, p.19-22, novembro de 2009.

FAGNANI, R.; CARRARO, P. E.; BATTAGLINI, A. P. P.; ARAÚJO, J. P. A.; Alterações na densidade e crioscopia do leite pela adição de diferentes concentrações de citrato e fortificante. Revista Caatinga, v. 27, n. 4, p. 208-215, dezembro de 2014.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, Perspectivas para segurança alimentar e nutricional no Brasil, Saúde e Sociedade v.12, n.1, p.12-20, jan-jun 2003.

FORSYTHE, S. J., Microbiologia da Segurança Alimentar, 1° edição, cáp. 5, p.155-159, Porto Alegre, 2002.

FRANCO, B.G.M.F; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

GONZALEZ, H. L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; GOMES, J. F.; STUMPF, W. J.; SILVA, M. A. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1531-1543, dezembro de 2004.

HITCHINS, A. D., FENG, P., WATKINS, W D., RIPPEY, S.R. & CHANDLER, L. A., *Escherichia coli* e os coliformes. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8° edição, cap. 4, Gaithersburg, EUA.

Hospital Estadual de Bauru, FAMESP. Acessado em: http://www.heb.bauru.unesp.br/sobre.php>, aos dias 17 de agosto de 2016.

KAKU, M.; PERESI, J. T. M.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; BATISTA, A. B.; CASTANHEIRA, I. A. Z.; GARCIA, G. M. P.; IRINO, K.; GELLI, D. S. Surto alimentar por *Salmonella Enteritidis* no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. Revista Saúde Pública, vol. 29, p. 127-131, 1995.

LIMA, A. R. C.; BARROS, L. M.; ROSA, M. S.; CARDONHA. A. M. S.; DANTAS, M. A. M. Avaliação microbiológica de dietas enterais manipuladas em um hospital, Ata

Cirúrgica Brasileira, vol. 20, Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005.

MADALOSSO, G.; BRITO, S. DO N.; PAVANELLO, E. I.; RAMOS, S. R. T. S, ARAÚJO, E. S.; JURADO, R. A. R.; BORGHI, M. C. & EDUARDO, M. B. DE P. Surto alimentar por *Salmonella* enterica sorotipo Enteritidis em restaurante, São Paulo, SP: dezembro de 2006. *BEPA.* Boletim Epidemiológico Paulista (Online), *5*(55), 05-11.

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 Serviço de Saúde, ed. 20, p. 401-407, julho de 2011.

MENDES, C G.; SILVA, J. B. A.; MESQUITA, L. X.; MARACAJA, P. B. As análises de mel: Revisão. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) Revista Caatinga, v. 22, n. 2, p. 07-14, abril de 2009.

MENDES, C. de G.; SILVA, J. B. A.; MESQUITA, L. X. de; MARACAJA, P. B. As análises de mel: revisão. Revista Caatinga, Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), v.22, n.2, p.07-14, junho de 2009.

MERCOSUL, Resolução número 15/1998 - Regulamento técnico MERCOSUL de identidade e qualidade do mel, 1998.

MESQUITA, M. O de; VALENTE, T. P.; ZIMMERMANN, A. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Qualidade físico-química da carne bovina *in natura* aprovada na recepção de restaurante industrial. Vigilância Sanitária em Debate, p. 103-108, 2014.

OLIVEIRA, A. B A; PAULA, C. M D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I.; TONDO E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: Uma revisão, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Epidemiologia e Serviço de Saúde Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010, p. 30-33.

ONU - Organização das Nações Unidas, Fatos sobre a Alimentação, Departamento de Informação Pública das Nações Unidas, junho de 2012.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* no serviço de alimentação hospitalar. Revista de Nutrição, Campinas. Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2004.

RIBEIRO, M.; MARQUES, L.; ZANELA, M.; STUMPF, W. Jr.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não-ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. Revista Brasileira da Agrociência, v. 13, n. 1, p. 91-97, janeiro de 2007.

RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. Ciência Rural, Santa Maria, v.35, .25, p.1166-1171, outubro de 2015.

SILVA, M. P., CAVALLI D. R., OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão de coliformes a 45EC e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e pertrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 352-359, Campinas, São Paulo, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; dos SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. Cap. 4 Técnicas básicas de contagem de micro-organismos pelo Número Mais Provável, p. 61-69, 3° edição, São Paulo, 2007.

SILVA, S. J. N. da; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEIN, M. H.;JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocinética capilar micelar; Ciência e Tecnologia de Alimentos; 28; 46-50; 2008.

TRONCO, V. M.; Manual para Inspeção da Qualidade do Leite, 3° edição, cap. V, p. 131-141, 3° edição, editora UFSM, 2008.

UNESP – Universidade Estadual Paulista, Disponível em : http://www.fmvz.unesp.br/#!/instituicao/apresentacao/ Acessado em: 8 de Agosto de 2016.

VIEIRA, A. A.; MOREIRA, M. E. L.; ROCHA, A. D.; PIMENTA, H. P.; LUCENA, S. L. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento. Jornal de Pediatria da Sociedade Brasileira de Pediatria, Rio de Janeiro, p. 490-494, 2004.

WALTER, B., Perspectivas para a segurança alimentar e nutricional do Brasil, Saúde e Sociedade, v.12, n.1, p.12-20, jan-jun 2003.