



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
LYSSANI CAINNY DA SILVA MARCOLINO

**ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS MATÉRIAS-PRIMAS DE UMA INDÚSTRIA
ALIMENTÍCIA, APONTADAS COMO POSSÍVEIS AGENTES BIOLÓGICOS,
BASEADO NA IMPLANTAÇÃO DO PROGRAMA HAZARD ANALYSIS AND
CRITICAL CONTROL POINT - HACCP**

Tubarão
2019



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
LYSSANI CAINNY DA SILVA MARCOLINO

**ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS MATÉRIAS-PRIMAS DE UMA INDÚSTRIA
ALIMENTÍCIA, APONTADAS COMO POSSÍVEIS AGENTES BIOLÓGICOS,
BASEADO NA IMPLANTAÇÃO DO PROGRAMA HAZARD ANALYSIS AND
CRITICAL CONTROL POINT - HACCP**

Relatório Técnico/Científico apresentado ao Curso de
Química Bacharel da Universidade do Sul de Santa
Catarina como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Química.

Prof. Dra. Suzana Cimara Batista (Orientadora)

Tubarão

2019

LYSSANI CAINNY DA SILVA MARCOLINO

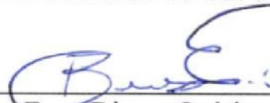
**ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS MATÉRIAS PRIMAS DE UMA
INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA, APONTADAS COMO POSSÍVEIS AGENTES
BIOLÓGICOS, BASEADO NA IMPLANTAÇÃO DO PROGRAMA HAZARD
ANALYSIS AND CRITICAL CONTROL POINT – HACCP**

Este relatório técnico/científico foi julgado adequado à obtenção do título de Bacharel em Química e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Química Bacharelado da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 19 de junho de 2019.



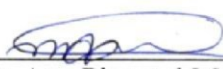
Professora Bel. Lic. Suzana Cimara Batista, Dra. (Orientadora)
Universidade do Sul de Santa Catarina



Professor Eng. Diogo Quirino Buss, Esp. (Avaliador)
Universidade do Sul de Santa Catarina



Professor Bel. Domingos Pignatel Marcon, MSc. (Avaliador)
Universidade do Sul de Santa Catarina



Professora Eng. Maria Ana Pignatel Marcon Martins, Dra. (Avaliadora)
Universidade do Sul de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, que me deu o dom da vida e me deu forças para chegar onde me encontro hoje.

Aos meus familiares que me apoiaram, em especial a minha mãe, por ter me ensinado o valor dos estudos e a correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu esposo, André, que com muito amor e carinho me encorajou a continuar sempre que eu quis desistir, que sonhou comigo este sonho e que, com muita paciência, viveu esta intensa jornada que é a vida acadêmica.

Aos meus amigos Paulo Sérgio e Jéssica, que acompanharam todos os obstáculos que enfrentei e me deram forças em todos os momentos, amigos este que a faculdade me deu, mas que quero levar para a vida. A minha amiga Grazielly, pela ajuda com a revisão do relatório e por estar sempre presente nos momentos bons e ruins. A outros amigos que a vida me deu e que de alguma forma estiveram presentes nessa conquista.

À empresa e aos meus colegas de trabalho, que não mediram esforços para conseguir os materiais para as análises, para me cobrir no tempo que precisei ficar fora e me apoiarem neste momento importante, em especial à Bruna, Caroline, Gabriela, Arrison, Jaison e Fernando.

A Professora Suzana e ao Professor Gilson pelo companheirismo, amizade e orientação. Vocês foram primordiais para que este trabalho fosse finalizado.

E aos Professores da Unisul que de alguma forma contribuíram com ensinamentos e para a construção da profissional que venho me tornando.

“O saber consiste precisamente em dar saída à luz que vem de dentro e não abrir portas à luz que vem de fora”. (Platão).

RESUMO

Atualmente tem-se observado a crescente preocupação da sociedade nos cuidados com a sua alimentação e em conhecer a procedência do alimento que se está ingerindo. Na perspectiva da implantação do Programa Hazard Analysis and Critical Control Point – HACCP, foram feitas análises microbiológicas de quatro matérias-primas do setor produtivo de uma empresa alimentícia, sendo que duas delas tinham em seus laudos, informações sobre análises microbiológicas e as outras duas não tinham essas informações. Dentro do Programa HACCP, procura-se detectar quais os pontos críticos de controle que podem interferir na segurança do produto final, sendo assim, uma matéria-prima fornecida sem as informações microbiológicas em seu laudo, tem que ser avaliada para verificar se tem a possibilidade desta ser considerada um agente biológico que poderá interferir na segurança alimentar. Para esta investigação, as matérias-primas foram submetidas as mesmas análises microbiológicas que são feitas no produto acabado, sendo estas as análises de *Coliformes* e *Escherichia Coli*, *Estafilococos coagulase positiva*, *Bacillus Cereus* e *Salmonella*. Foi observado pelos resultados das análises microbiológicas que é de extrema importância estas análises nas matérias-primas bem como os cuidados de higiene para a execução destes ensaios de forma a fornecer ao consumidor um produto final seguro para consumo.

Palavras-chave: Análises Microbiológicas; HACCP; Segurança alimentar.

ABSTRACT

Nowadays there's a growing concern by society with your diet and knowing the origin of the food you're eating. In the implementation view of the Hazard Analysis and Critical Control Point Programme – HACCP, microbiological analyses of four raw materials from the productive sector of a food company were made, in which two of them had information about microbiological analysis on its reports and another two didn't have those data. Inside the HACCP Programme, it's been seeking to detect the control critical points that can impair the safety of the final product, therefore, a raw material provided without that microbiological information on its report must be evaluated to verify the possibility of that being a biological agent that may interfere with the food safety. For this study, the raw materials were submitted to the same microbiological analysis made to the final product, those being Coliforms and *Escherichia Coli*, *Staphylococcus coagulase positive*, *Bacillus Cereus* and *Salmonella* analysis. It was observed from the results of the microbiological analyses that these analyses are extremely important in raw materials, as well as the hygiene care for the performance of those tests in order to deliver a safe final product for consumption.

Keywords: Microbiological Analyses; HACCP; Food Safety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Investigação de <i>Salmonella</i> no sorbitol	38
Figura 2 - Investigação de <i>Coliformes</i> e <i>Escherichia Coli</i> no sorbitol.....	39
Figura 3 - Investigação de <i>B. Cereus</i> no Sorbitol.....	40
Figura 4 – Investigação de <i>Estafilococos coagulase positiva</i> no sorbitol	41
Figura 5 – Investigação de <i>Salmonella</i> no carbonato de cálcio.....	42
Figura 6 – Investigação de <i>Coliformes</i> e <i>Escherichia Coli</i> no carbonato de cálcio	44
Figura 7 – Investigação de <i>B. Cereus</i> no carbonato de cálcio	45
Figura 8 – Investigação de <i>Estafilococos coagulase Positiva</i> no carbonato de cálcio	46
Figura 9 – Investigação de <i>Salmonella</i> no sulfato de magnésio.....	47
Figura 10 – Investigação de <i>Coliformes</i> e <i>Escherichia Coli</i> no sulfato de magnésio	48
Figura 11 - Reanálise para confirmação de <i>Coliformes</i> e <i>Escherichia Coli</i>	48
Figura 12 – Investigação de <i>B. Cereus</i> no sulfato de magnésio	49
Figura 13 – Investigação de <i>Estafilococos coagulase positiva do sulfato de magnésio</i>	50
Figura 14 – Investigação de <i>Salmonella</i> na amostra de maltodextrina	52
Figura 15 – Investigação de <i>Coliformes</i> e <i>E. Coli</i> na maltodextrina.....	53
Figura 16 – Investigação de <i>B. Cereus</i> na maltodextrina	54
Figura 17 – Investigação de <i>Estafilococos coagulase positiva</i> na maltodextrina	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Documentação e Registros segundo <i>Codex Alimentarius</i>	22
Tabela 2 - Materiais e equipamentos utilizados para análise de <i>Salmonella</i>	31
Tabela 3 - Materiais e equipamentos utilizados para análise de <i>Coliformes</i> e <i>Escherichia Coli</i>	31
Tabela 4 - Materiais e equipamentos utilizados para análise de <i>B. Cereus</i>	31
Tabela 5 - Materiais e equipamentos utilizados para análises de <i>Estafilococos coagulase positiva</i>	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA	14
1.2 HIPÓTESES	15
1.3 OBJETIVOS	16
1.3.1 Objetivo Geral	16
1.3.2 Objetivos Específicos.....	16
1.4 RELEVANCIA SOCIAL E CIENTÍFICA	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 <i>CODEX ALIMENTARIUS</i>	18
2.1.1 Princípios Gerais de Higiene Alimentar.....	18
2.2 IMPLANTAÇÃO DO HAZARD ANALYSIS AND CRITICAL CONTROL POINT - HACCP.....	19
2.2.1 Princípios do HACCP	20
2.2.1.1 Análises de Riscos.....	20
2.2.1.2 Pontos Críticos de Controle.....	20
2.2.1.3 Limites Críticos	21
2.2.1.4 Sistema de Monitoração	21
2.2.1.5 Estabelecer ações corretivas	21
2.2.1.6 Procedimentos de Verificação	22
2.2.1.7 Manutenção dos Registros.....	22
2.3 MATÉRIAS-PRIMAS	23
2.3.1 Sorbitol	24
2.3.2 Carbonato de Cálcio.....	24
2.3.3 Sulfato de Magnésio	24
2.3.4 Maltodextrina	25
2.4 AMOSTRAGEM	25
2.5 AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA	25
2.5.1.1 <i>Resolução de Diretoria Colegiada - RDC</i>	26
2.5.2 Análises Microbiológicas	26
2.5.2.1 <i>Salmonella</i>	26
2.5.2.2 <i>Coliforme a 45°C/g</i>	27

2.5.2.3	<i>Bacillus Cereus</i>	28
2.5.2.4	<i>Estafilococos coagulase positiva</i>	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO REALIZADO.....	29
3.2	HISTÓRICO DO PROCESSO	30
3.2.1	Caracterização dos materiais selecionados a serem utilizados nos seguintes ensaios:.....	30
3.2.1.1	<i>Ensaio para investigação de Salmonella</i>	30
3.2.1.2	<i>Ensaio para investigação de Coliformes e Escherichia Coli</i>	31
3.2.1.3	<i>Ensaio para investigação de Bacillus Ceureus</i>	31
3.2.1.4	<i>Ensaio para investigação de Estafilococos coagulase positiva</i>	32
3.2.2	Análises Microbiológicas	32
3.2.2.1	<i>Salmonella</i>	33
3.2.2.2	<i>Coliformes e Escherichia Coli</i>	34
3.2.2.3	<i>Bacillus Ceureus</i>	35
3.2.2.4	<i>Estafilococos Coagulase Positiva</i>	36
3.3	ANÁLISE DOS DADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	37
3.3.1	Análises microbiológica da matéria-prima selecionada	38
3.3.1.1	<i>Ensaio para investigação de Salmonella</i>	38
3.3.1.2	<i>Ensaio para investigação de Coliforme e Escherichia coli</i>	39
3.3.1.3	<i>Ensaio para investigação de Bacillus Cereus</i>	40
3.3.1.4	<i>Ensaio para investigação de Estafilococos Coagulase Positiva</i>	41
3.3.2	Análises microbiológicas da matéria-prima selecionada.....	42
3.3.2.1	<i>Ensaio para investigação de Salmonella</i>	42
3.3.2.2	<i>Ensaio para investigação de Coliformes e Escherichia Coli</i>	43
3.3.2.3	<i>Ensaio para investigação de Bacillus Cereus</i>	44
3.3.2.4	<i>Ensaio para investigação de Estafilococos Coagulase Positiva</i>	46
3.3.3	Análise microbiológica da matéria-prima selecionada	47
3.3.3.1	<i>Ensaio para investigação de Salmonella</i>	47
3.3.3.2	<i>Ensaio para investigação de Coliformes e Escherichia Coli</i>	48
3.3.3.3	<i>Ensaio para investigação de Bacillus Cereus</i>	49
3.3.3.4	<i>Ensaio para investigação de Estafilococos Coagulase Positiva</i>	50
3.3.4	Análises microbiológicas da matéria-prima selecionada.....	52
3.3.4.1	<i>Ensaio para investigação de Salmonella</i>	52

3.3.4.2	<i>Ensaio para investigação de Coliformes e Escherichia Coli</i>	53
3.3.4.3	<i>Ensaio para investigação de Bacillus Cereus</i>	54
3.3.4.4	<i>Ensaio para investigação de Estafilococos Coagulase Positiva</i>	55
4	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE	61
	APÊNDICE A – ESQUEMA DOS ENSAIOS PARA INVESTIGAÇÃO DE SALMONELLA	62
	APÊNDICE B – ESQUEMA DOS ENSAIOS PARA B. CEREUS, ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA E COLIFORMES E E. COLI	63
	APÊNDICE C – ENSAIO PARA ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA NO SORBITOL	64
	APÊNDICE D – ENSAIO PARA COLIFORMES E ESCHERICHIA COLI NO SORBITOL	65
	APÊNDICE E – ENSAIO PARA B. CEREUS NO SORBITOL	66
	APÊNDICE F – ENSAIO PARA INVESTIGAÇÃO DE SALMONELLA NO SORBITOL	67
	APÊNDICE G – ENSAIO PARA ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA NO CARBONATO DE CÁLCIO	68
	APÊNDICE H – ENSAIO PARA COLIFORMES E E. COLI NO CARBONATO DE CÁLCIO	69
	APÊNDICE I – ENSAIO PARA B. CEREUS NO CARBONATO DE CÁLCIO	70
	APÊNDICE J – ENSAIO PARA SALMONELLA NO CARBONATO DE CÁLCIO	71
	APÊNDICE K – TRIPLACA PARA SALMONELLA COM COLÔNIAS ATÍPICAS	72
	APÊNDICE L – ENSAIO PARA ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA NA MALTODEXTRINA	73
	APÊNDICE M – ENSAIO PARA COLIFORMES E E. COLI NA MALTODEXTRINA	74
	APÊNDICE N – ENSAIO PARA B. CEREUS NA MALTODEXTRINA	75
	APÊNDICE O – ENSAIO PARA SALMONELLA NA MALTODEXTRINA	76
	APÊNDICE P – CRESCIMENTO DE COLÔNIAS ATÍPICAS EM TRIPLACA PARA SALMONELLA	77
	APÊNDICE Q – ENSAIO PARA ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA NO SULFATO DE MAGNÉSIO	78

APÊNDICE R – CRESCIMENTO DE COLÔNIAS ATÍPICAS EM ÁGAR <i>BAIRD PARKER</i> PARA <i>ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA</i>	79
APÊNDICE S – ENSAIO PARA <i>COLIFORMES E E. COLI</i> NO SULFATO DE MAGNÉSIO	80
APÊNDICE T – CRESCIMENTO DE COLÔNIAS ATÍPICAS EM ÁGAR BAIRD ECC PARA <i>COLIFORMES E E. COLI</i>	81
APÊNDICE U – RENÁLISE PARA <i>COLIFORMES E E. COLI</i> NO SULFATO DE MAGNÉSIO	82
APÊNDICE V – ENSAIO PARA <i>B. CEREUS</i> NO SULFATO DE MAGNÉSIO	83
APÊNDICE X – ENSAIO PARA <i>SALMONELLA</i> NO SULFATO DE MAGNÉSIO	84

1 INTRODUÇÃO

Difícilmente se fala sobre microbiologia sem lembrar-se de Louis Pasteur, quem deu início a ciência da microbiologia nos anos entre 1854 e 1864, verificando que as bactérias eram os agentes causadores de deterioração dos alimentos e de doenças causadas pelo mesmo. Através dessa descoberta que a indústria francesa iniciou o procedimento de aquecer os vinhos para eliminação de organismos contaminantes, antes da inserção dos microrganismos necessários para a fermentação. (FORSYTHE, 2013).

No decorrer dos anos, tem-se observado muitos surtos de DTAs – Doenças Transmitidas por Alimentos, que em geral causam náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia entre outros sintomas, em alguns casos podendo ser fatal se não tratada corretamente. Normalmente as DTAs são causadas por microrganismos existentes nos alimentos. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A segurança alimentar tem cada vez mais preocupado os consumidores, os órgãos fiscalizadores e, conseqüentemente, aqueles que estabelecem as legislações relacionadas a qualidade dos alimentos.

Para assegurar a qualidade de um alimento, as indústrias alimentícias seguem as RDCs – Resoluções de Diretorias Colegiadas e as normativas estabelecidas pela ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária e aconselhados pela Resolução das Nações Unidas 39/248 de 1985 baseiam-se nos códigos de conduta e orientações citadas pelo *Codex Alimentarius*.

No *Codex Alimentarius* encontramos o código de práticas internacionalmente recomendadas, que contêm os princípios gerais da higiene alimentar e instrui as indústria a aplicarem suas recomendações utilizando os princípios do HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point*, que se encontra anexado no mesmo documento. Os princípios do HACCP visam a segurança alimentar, apontando os agentes físicos, químicos e biológicos, que podem colocar em risco a qualidade do produto final, criando também ações de controle para minimizar ou, até mesmo, extinguir os riscos, garantindo a qualidade do produto que chega ao consumidor. (FAO, 2019).

Assim, o objetivo geral desse trabalho é avaliar se as matérias-primas fornecidas para a empresa em questão, podem ser consideradas agentes biológicos segundo os princípios do HACCP, considerando que os laudos de algumas dessas matérias-primas contêm informações microbiológicas, sendo realizada análise apenas para confirmação dessa informação. Ainda, outras matérias-primas não contêm essas informações no laudo, sendo

analisadas para verificação, se há riscos ou não em se aceitar laudos sem as devidas informações.

1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA

Com o avanço das tecnologias e da ciência, as pessoas têm andado em um ritmo totalmente acelerado, onde se busca de todas as formas a praticidade para conseguir realizar o maior número possível de tarefas ao mesmo tempo.

Consequentemente, a busca por alimentos que facilitam a rotina acelerada da humanidade, leva as pessoas a uma despreocupação com a qualidade das suas alimentações diárias, com a inclusão em seu cardápio de alimentos como *fast foods*, entre outros, sem a necessária preocupação com o valor nutricional que ingere. Um dos fatores a que se pode creditar esse problema é que os efeitos de uma alimentação inadequada não são imediatos, isto é, ocorrem lentamente no corpo humano e, por ser um fenômeno implícito, não preocupam os desavisados ou “apressados”.

Devido a essa falta de tempo e despreocupação com a alimentação, o índice de obesidade e de doenças acarretadas pela deficiência nutricional no Brasil tem aumentado constantemente. Assim, a longo prazo, irá acarretar graves consequências para a saúde do corpo humano, chamando atenção dos órgãos responsáveis e colocando em alerta a sociedade.

Nos últimos anos, devido a vigilância do ministério da saúde, viu-se a necessidade de repensar qual a melhor forma de suprir as carências nutricionais acarretadas pela má alimentação. Devido a isso, observou-se o surgimento no mercado alimentício de suplementos vitamínicos e minerais, que conforme a constatação da carência de vitaminas ou minerais (que é ocasionada também pela alimentação inadequada) através de consultas médicas e exames laboratoriais, pudessem suprir essas necessidades alimentares.

Como os suplementos vitamínicos e minerais se encontram no ramo alimentício, para a produção dos mesmos a indústria alimentícia baseia-se nas legislações para esse tipo de mercado e dentro dessas normativas fiscalizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, encontra-se a análise microbiológica do alimento, onde, através de métodos específicos, conseguimos garantir que o produto vai ao mercado e, consequentemente, para a mão do consumidor sem nenhum tipo de contaminação.

Para garantir ao consumidor que o produto que chega às prateleiras são seguros, muitas indústrias alimentícias investem na aplicação de um sistema que identifica, avalia e

controla perigos considerados significativos a segurança alimentar chamado *Hazard Analysis and Critical Control Point* – HACCP. Neste sistema, é feita a análise dos perigos e dos pontos críticos do processo podendo classificá-los como agentes químicos, físicos ou biológicos, que se não forem controlados podem afetar negativamente a segurança do alimento.

Em função da importância das análises microbiológicas e dos princípios de higiene alimentar para a segurança do consumidor, baseado na implantação do sistema HACCP, viu-se a importância da verificação microbiológica de algumas matérias-primas, classificando-as como agente biológico, pelo fato de algumas destas serem fornecidas para indústria de alimentos sem informações de análises microbiológicas em seus laudos. Também, a importância de verificar-se as matérias-primas que contenham essas informações em seu laudo, para confirmação dos dados fornecidos pelos fornecedores/distribuidores.

Então, descrevemos a pergunta central dessa pesquisa como sendo: **as matérias-primas utilizadas na indústria alimentícia, com ou sem informações de análises microbiológicas em seus laudos, podem ser apontadas, como agentes biológicos, de acordo com os critérios exigidos na implantação do sistema HACCP**, em estudo realizado no ano de 2019 na cidade de Tubarão/SC.

1.2 HIPÓTESES

A resposta a hipótese principal (problema de pesquisa), foi obtida através da confirmação e/ou refutação das seguintes hipóteses:

- As matérias-primas com laudo microbiológico estão isentas de agentes biológicos contaminantes.
- As matérias-primas com laudo microbiológico não estão isentas de agentes biológicos contaminantes
- As matérias-primas sem laudo microbiológico estão isentas de agentes biológicos contaminantes.
- As matérias-primas sem laudo microbiológico não estão isentas de agentes biológicos contaminantes.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Analisar as matérias-primas utilizadas na indústria alimentícia, com ou sem informações de análises microbiológicas em seus laudos, que podem ser apontadas, como agentes biológicos, de acordo com os critérios exigidos para implantação do sistema HACCP, visando oferecer segurança aos consumidores.

1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar os princípios gerais de higiene alimentar;
- b) Descrever os princípios do sistema HACCP;
- c) Analisar matérias-primas selecionadas através de ensaios microbiológicos;
- d) Descrever legislações que englobam as análises microbiológicas para alimentos;
- e) Identificar as análises microbiológicas à que cada matéria-prima selecionada deve ser submetida.
- f) Promover segurança alimentar à sociedade que consome os alimentos produzidos a partir das matérias-primas analisadas.

1.4 RELEVANCIA SOCIAL E CIENTÍFICA

A sociedade atual acelerou seus passos para acompanhar o vertiginoso crescimento científico e tecnológico das últimas décadas. Essa necessidade de otimizar suas ações leva muitas pessoas a alimentações rápidas e, em muitos casos, inadequadas para a sua saúde. As constatações descritas subscrevem a importância social da investigação realizada que quer, sobretudo, disponibilizar critérios de segurança aos alimentos consumidos diariamente.

A dinamicidade adquirida pela sociedade e as novas necessidades que surgem a cada dia, exige o oferecimento de produtos e serviços que combinem com o novo cenário apresentado. Por isso, quando se investiga e analisa matérias-primas de produtos alimentares para identificar sua eficácia, poder-se-á disponibilizar de resultados que propiciarão novas

posturas de fabricantes, comercializadores e pesquisadores sempre buscando aperfeiçoar seus produtos e assim propiciar segurança à população. Essa é a relevância científica do estudo realizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CODEX ALIMENTARIUS

Segundo a ANVISA, a Resolução das Nações Unidas 39/248 de 1985, recomenda aos governos que tenham como base o *Codex Alimentarius*, para a criação de políticas e planos nacionais relacionados a alimentos. Vejamos:

O *Codex Alimentarius* é um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), criado em 1963, com o objetivo de estabelecer normas internacionais na área de alimentos, incluindo diretrizes, padrões de produtos e códigos de boas práticas. (BRASIL, 2019).

Sendo dessa forma, quando uma empresa se baseia nos princípios do *Codex Alimentarius*, ela garante a qualidade do seu produto e a segurança alimentar.

2.1.1 Princípios Gerais de Higiene Alimentar

Para se obter uma eficiência na limpeza e desinfecção nos setores produtivos alimentícios, procura-se a implantação de programas que possam diminuir a incidência de contaminações. Ter um programa de limpeza e desinfecção eficaz afeta consideravelmente na qualidade do produto. Porém, a segurança de um alimento sem contaminação não depende somente desses programas eficientes, pois os defeitos no projeto sanitário de equipamentos ou na estrutura física de uma indústria podem também interferir na produção de um alimento seguro. (FORSYTHE, 2013).

No *Codex Alimentarius*, encontramos o código de práticas internacionais recomendadas para os princípios gerais de higiene alimentar, CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. Nesses são estabelecidos critérios salientando os controles de higiene desde a produção primária até o consumo final.

Com o código de práticas internacionais recomendadas, o *Codex Alimentarius* tem como objetivo “[...] identificar os princípios essenciais de higiene alimentar aplicáveis ao longo da cadeia alimentar, por forma a atingir o objetivo de garantir que os alimentos são seguros e adequados ao consumo humano [...]” sugerir uma aplicação baseada no sistema HACCP que será descrito adiante, apontar qual melhor forma para implantação desses princípios, bem como,

orientar a utilização de códigos específicos que poderão ser essenciais para ampliar as exigências específicas sobre higiene para cada área. (FAO, 2019).

2.2 IMPLANTAÇÃO DO HAZARD ANALYSIS AND CRITICAL CONTROL POINT - HACCP

Para a implantação de um sistema HACCP se tornar possível é preciso um comprometimento de todos os funcionários da empresa, em especial de toda a liderança, incluindo a direção da mesma. Pois, quando um funcionário observa que seu superior se preocupa com a garantia de um produto seguro, isso o incentiva a fazer com que isso aconteça. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O grupo que será formado para a elaboração do plano HACCP deverá ser composto por pessoas de que tenham experiência em diversas áreas dentro da empresa. Pois essas pessoas serão os que “[...] irão analisar os perigos, os que irão monitorar os pontos críticos de controle, os que supervisionarão as operações nos pontos críticos de controle, os que farão os testes laboratoriais e os que farão as verificações de monitoramento [...]”. (*id bid*, p. 159).

Na teoria, a implantação do sistema HACCP é simples, porém quando se fala em um sistema como esse para um produto alimentício específico, pode ser que se precise de um tempo a mais para a implantação e até que os conceitos se consolidem trazendo retorno visível para a empresa. Essa implantação de um novo sistema pode, inicialmente, trazer um aumento de custos para a mesma, porém se aplicado de forma correta, com o tempo estes custos são recuperados pois há um aumento na produtividade e na qualidade do produto, consequentemente diminuindo as reclamações externas. (*id bid*).

Antes de se aplicar os sete princípios do HACCP é importante:

- Montar a equipe HACCP, conforme orientado anteriormente;
- Fazer uma descrição completa dos produtos;
- Identificar a intenção de uso pelo consumidor final;
- Elaborar um fluxograma que contenha todas as etapas do processamento;
- Confirmar se o fluxograma criado está dentro da realidade do processo em todas as etapas, podendo ser ajustado quando necessário.

Dessa forma faz-se importante observar os princípios descritos pelo autor para que haja adequado e eficiente resultado no processo. (FORSYTHE, 2013).

2.2.1 Princípios do HACCP

2.2.1.1 Análises de Riscos

Identificar nas etapas do processo produtivo perigos significativos que podem ocorrer, verificando ações preventivas. Os perigos devem ser listados em todas as etapas do processo “[...] desde a produção primária, o processamento, a manufatura, a distribuição até o consumo [...]”. (FORSYTHE, 2013, p. 405).

Na análise dos riscos devemos verificar:

- O possível acontecimento dos perigos e os seus danos para a saúde;
- Se os perigos avaliados são de caráter qualitativo ou quantitativo;
- A sobrevivência ou multiplicação dos microrganismos significativos;
- Se as toxinas, agentes químicos ou físicos são produzidos ou persistem nos alimentos;
- Condições que favoreçam as circunstâncias citadas acima.

Levando em consideração as ideias apontadas pelo autor, é de suma importância que as análises dos riscos sejam feitas de forma criteriosa. (*id bid*).

2.2.1.2 Pontos Críticos de Controle

Nesse segundo princípio a equipe HACCP identifica através da árvore decisória os pontos críticos de controle no processo produtivo que contribuem para a eliminação ou diminuição para um nível satisfatório dos riscos identificados no primeiro princípio. (ROCHA *et al.*, 2018).

Os procedimentos considerados pontos críticos de processos precisam ser quantificáveis de modo que os princípios seguintes de limites críticos e monitoramento possam ser aplicados. Se houver a existência de alguma etapa no processo que não exista medida de controle de processo, o mesmo deve ser modificado para aplicação de uma medida de controle. (FORSYTHE, 2013).

2.2.1.3 Limites Críticos

Para cada ponto crítico de controle deve ser especificado um limite crítico, porém deve-se garantir a possibilidade de aplicação desses limites na operação ou produtos classificados como ponto crítico. Frequentemente, os critérios utilizados como limites críticos “[...] incluem medições de temperaturas, de tempo, de nível de umidade, de pH, de A_w (atividade de água), de cloro disponível, e parâmetros sensoriais como a aparência visual e a textura [...]”. (FAO, 2019).

2.2.1.4 Sistema de Monitoração

Para a verificação dos dados referentes a monitorização deve-se designar uma pessoa com conhecimento e autoridade para efetuar ações corretivas quando houver necessidade. (FAO, 2019).

Monitorização é a medição ou observação programada de um ponto crítico de controle em função dos seus limites críticos. Os procedimentos de monitorização devem permitir detectar a perda de controle do ponto crítico de controle. Adicionalmente, a monitorização deve idealmente fornecer esta informação a tempo de efetuar ajustamentos de forma a garantir o controle do processo, para impedir a violação dos limites críticos. (*id bid*).

Essa monitorização precisa ser contínua para garantir que o processo avaliado como ponto crítico está sob controle. Também deverá ser executada de forma ágil, pois se refere a processos contínuos, necessitando da aplicação de testes analíticos rápidos, dando preferência sempre a testes físico-químicos ao invés de testes microbiológicos. (*id bid*).

2.2.1.5 Estabelecer ações corretivas

Para cada ponto crítico de controle são desenvolvidas ações corretivas, que servem para lidar com os desvios dos limites de controle detectados na monitoração. Elas são criadas para retomada de controle e para garantir que o produto afetado seja devidamente reprocessado ou descartado. (FORSYTHE, 2013).

2.2.1.6 Procedimentos de Verificação

Neste princípio é verificado com uma frequência suficiente se o sistema HACCP está funcionando de forma eficaz. Para essa verificação são estabelecidos quatro processos:

- Analisar se os limites críticos adotados são satisfatórios;
- Garantir o funcionamento do plano HACCP elaborado;
- Documentar revalidações periódicas, independente do processo de verificação;
- Assegurar que o sistema HACCP tenha sido implementado de forma correta.

(FORSYTHE, 2013).

Segundo FORSYTHE 2013, “[...] os métodos de verificação e auditoria, procedimentos e testes, incluindo análises de amostras aleatórias, podem ser utilizados para determinar se isso está ocorrendo [...]”.

Algumas atividades que se enquadram como verificação, dentre elas:

- Inspeção no sistema e do plano HACCP implementado;
- Revisão dos desvios e do destino dado aos produtos;
- Confirmação de que os pontos críticos de controle estão sob controle.

Sendo assim, as verificações são fundamentais para garantir que o sistema HACCP implantado ainda continua em funcionamento. (*id bid*).

2.2.1.7 Manutenção dos Registros

Neste princípio, vemos a importância de todo o plano HACCP estar documentado, pois desta forma conseguimos garantir a segurança de um produto e verificar quais ações deverão ser tomadas nos desvios de limites críticos. Abaixo segue tabela de exemplos sobre o que incluir na documentação e exemplos de registros que também devem ser inclusos:

Tabela 1- Documentação e Registros segundo *Codex Alimentarius*

Contam-se na Documentação	Contam-se no Registro
Análise dos Perigos;	Atividades de Monitorização;
Determinação dos Pontos Críticos Controle;	Desvios e Ações corretivas associadas;

Determinação dos Limites Críticos.	Procedimentos de Verificação Executados;
	Modificações do plano HACCP.

Fonte: da autora, 2019.

2.3 MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas podem ser consideradas uma das principais fontes de contaminação para os alimentos. Para diminuir os riscos da utilização de uma matéria-prima contaminada, pode-se solicitar que os fornecedores contenham capacitações e certificados de qualidade. Também pode ser feito o monitoramento da temperatura no recebimento entre outras análises conforme a necessidade e assim garantir uma matéria-prima segura, que futuramente não irá interferir na qualidade do produto final. (FORSYTHE, 2013).

O *Codex Alimentarius*, em seu Código de Princípios Gerais de Higiene alimentar, sempre recomenda uma abordagem baseada no sistema HACCP, onde é feito o levantamento dos pontos críticos, no qual possivelmente pode vir a contaminar o produto final. Ao receber uma matéria-prima sem as informações sobre o cuidado, preparo e análises que a mesma foi submetida, todo um setor produtivo pode ser colocado em risco. Baseado nisso, vemos a importância de se controlar o recebimento de uma matéria-prima e como a ausência de cuidados apropriados pode afetar segurança alimentar.

Com um embasamento no sistema HACCP, mesmo com o cuidado de se obter uma matéria-prima que contenha laudo com todas as especificações exigidas, nem sempre este laudo é de todo confiável. Em alguns casos, é necessária uma maior rigidez na análise da mesma, se possível, com uma verificação da veracidade do laudo, através de análises químicas ou microbiológicas, internas ou externas, dependendo da possibilidade de cada empresa, ou até mesmo da criação de programas de auditorias no local onde o fornecedor armazena ou produz a matéria-prima. (FAO, 2019).

Nas sessões 2.3.1 e 2.3.2 estão descritas as matérias-primas que contêm informações de análises microbiológicas em seus laudos, sendo analisadas para confirmação de dados. Já nas sessões 2.3.3 e 2.3.4 estão descritas aquelas matérias-primas que não contêm informações de análises microbiológicas em seus laudos, podendo ser consideradas um ponto crítico, já que se ela estiver contaminada pode afetar todo um setor produtivo, podendo gerar prejuízos financeiros à empresa e se não detectada a contaminação no produto final, pode afetar a saúde do consumidor.

Para a seleção das matérias-primas que seriam submetidas a análise, foi consultado o supervisor de produção e feita uma verificação das ordens de produção da empresa, onde constam essas informações, para verificar quais as matérias-primas que eram utilizadas na maior parte dos produtos fabricados na indústria alimentícias em questão.

2.3.1 Sorbitol

O sorbitol pode ser apresentado de duas formas, como pó cristalino branco ou como uma solução aquosa de sorbitol a 70% com aparência de um líquido viscoso. Ele tem um sabor doce e é utilizado nas indústrias farmacêuticas e alimentícias como “[...] excipiente, aglutinante, edulcorante ou desagregante em medicamentos e umectante em cosméticos [...]” podendo também ser utilizados em cápsulas como plastificante para a gelatina. (GIL; BRANDÃO, p. 248, 2007).

2.3.2 Carbonato de Cálcio

O carbonato de cálcio (CaCO_3) pode ser usado em indústrias farmacêuticas e tecnológicas como excipiente em formulações sólidas, agindo com diluente. Serve também como base e agente abrasivo para produção de pastas de dentes. Em alguns casos, atua como antiácido e também pode ser usado como tamponante e como degradante químico. (GIL; BRANDÃO, 2007).

2.3.3 Sulfato de Magnésio

Existem relatos de que a deficiência de magnésio pode promover alterações bioquímicas no corpo humano e também que esta deficiência pode estar ligada a várias doenças como as cardiovasculares, pré-eclâmpsia, derrame, hipertensão, diabetes e até enxaqueca. Esse mineral participa de algumas ações metabólicas e catabólicas e é considerado muito importante para as reações celulares, sendo fundamental também para as atividades enzimáticas no corpo humano. Assim sendo, o sulfato de magnésio pode ser utilizado na fabricação de suplementos vitamínicos para reposição de magnésio quando houver sua deficiência no organismo humano. (AMORIM, 2007).

2.3.4 Maltodextrina

A maltodextrina tem a característica de um pó branco, composto por uma combinação de dextrina e maltose e também pode ser indicada como um polímero de dextrose e glicose. Estas são metabolizadas lentamente no organismo humano fornecendo energia ao longo de atividades físicas de longa duração, possibilitando uma liberação gradativa de glicose na corrente sanguínea. Ela é considerada um carboidrato complexo de absorção constante “[...] obtida por hidrólise parcial enzimática do amido de milho [...]”. (JARDIM; SOUZA; ANTUNES JUNIOR, 2017, p.180).

2.4 AMOSTRAGEM

Ao realizar uma amostragem de alimento, água ou matéria-prima, temos que ter em mente a importância de se fazer uma amostragem adequada, que nos traga informações reais das características microbianas do material analisado, pois dependendo dos critérios estabelecidos, ela irá contribuir na aceitação e rejeição do lote em questão. (LIGHTFOOT; MAIER, 2003).

Levando em consideração que os microrganismos não estão distribuídos por todo o lote que será submetido a análise de forma uniforme, pode-se dizer que “[...] quanto maior for o número de unidades de um produto submetido a análise, maior será o significado estatístico do resultado obtido [...]”. (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 149). Devido a esse fato, é importante que a amostragem realizada diminua as chances de se aceitar um lote que deveria ser reprovado e vice e versa. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.5 AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA

A ANVISA foi criada com o intuito de garantir a saúde coletiva, através de ações voltadas para o sistema de saúde e padronizações sanitárias, tendo como objetivo a diminuição e a prevenção de riscos à saúde coletiva. (SILVA; COSTA; LUCCHESI, 2018).

Segundo a ANVISA, sua finalidade institucional é promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos, fronteiras e recintos alfandegados. (BRASIL, 2019).

Sendo assim, é indispensável que as empresas fiscalizadas pela ANVISA, conheçam e executem as exigências da mesma, com rigor, para fornecer ao consumidor um produto de qualidade. (*id bid*).

2.5.1.1 Resolução de Diretoria Colegiada - RDC

A RDC nº 12, de janeiro de 2001, foi criada com a finalidade de complementar as ações sanitárias na área dos alimentos para segurança da saúde da população. Tendo como objetivo “[...] estabelecer os padrões microbiológicos sanitários para alimentos especificados e determinar os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano [...]” (BRASIL, 2019).

2.5.2 Análises Microbiológicas

Na RDC nº 12, são encontrados os parâmetros microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano. Contêm uma tabela que especifica o tipo de análise que deve ser feita para cada tipo de alimento. A indústria de alimentos objeto deste estudo, se enquadra em Suplementos Vitamínicos e Minerais e Similares, onde devem ser feitas análises microbiológicas seguindo as instruções para suplementos alimentares. Assim deverão ser feitas análises para *Salmonella*, *Coliformes* a 45° C/g, *Estafilococos coagulase positiva* e *Bacillus Cereus*. (BRASIL, 2001).

Esta resolução abrange os alimentos que se destinam ao consumo humano, isentando as matérias-primas utilizadas no processamento industrial, desde que estejam identificadas que não podem ser consumidas por ser humano na forma em que se apresentam. (BRASIL, 2001).

2.5.2.1 *Salmonella*

A *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e são bacilos gram-negativos que não produzem esporos, que se reproduzem numa temperatura ideal de 35-37 °C (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A contaminação por *Salmonella* tem registros em âmbito mundial, considerando-a uma das causas significativas de doenças de origem alimentar. (FORSYTHE, 2013). Suas células são vulneráveis ao calor, assim sendo, os alimentos são contaminados quando cozidos erroneamente ou por contaminação de um produto cozido por um cru. Podemos encontrar *Salmonella* no sistema gastrointestinal de seres humanos e animais, que presente em suas fezes, é uma das principais vias de contaminação alimentar, sobretudo nos alimentos de origem animal (CAMPBELL-PLATT, 2015).

Como existem vários tipos de *Salmonella* ela pode causar várias doenças que em alguns casos podem ser graves levando até a óbito. Entre as doenças causadas por essa bactéria estão: a febre tifoide, que tem como sintomas dor de cabeça, perda de apetite, dor abdominal, diarreia e febre contínua e a gastroenterite em que seus sintomas são diarreia, vômito e febre baixa (CAMPBELL-PLATT, 2015).

2.5.2.2 Coliforme a 45°C/g

Segundo Forsythe (2013), “coliforme é um termo geral para bactérias gram-negativas, anaeróbicas, facultativas, em forma de bastonetes”. Essas bactérias produzem gás a partir da glicose e outros açúcares e fazem a fermentação da lactose com produção de ácido e gás num período de 24 à 48 horas, sendo essas as características observadas para identificá-las. Uma das espécies mais conhecidas é a *Escherichia coli* (*E.Coli*), que é classificada no grupo dos *coliformes fecais*, onde fermenta a lactose produzindo gás a aproximadamente 45,5 °C.

Quando se é verificado a presença de *E.coli* em um alimento, considera-se um indicativo de contaminação microbiana de origem fecal, daí o termo *coliformes fecais*, sendo dessa forma considerado um alimento com condições higiênicas insatisfatórias (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Segundo o item 5.9.1 da RDC nº 12 [...] a denominação de "*Coliformes a 45°C*" é equivalente à denominação de "*Coliformes de origem fecal*" e de "*Coliformes - termotolerantes*". Caso seja determinada a presença de *Escherichia Coli*, deve constar no laudo analítico. [...]”, devido a isto foi feita a análise de *Coliformes e Escherichia Coli*.

Esse grupo de *coliformes fecais* pode ser chamado também de termotolerantes e é um subgrupo dos *coliformes totais*. A nomenclatura de *coliformes fecais*, vem sendo substituída por coliformes termotolerantes, devido ao conhecimento que se vem obtendo, de que no grupo

dos microrganismos que são capazes de fermentar a lactose em 24h a 45 °C, inclui alguns membros de origem não fecal. (SILVA *et al.*, 2010).

2.5.2.3 *Bacillus Cereus*

O *Bacillus Cereus* é caracterizado por ser um “[...] bacilo gram-positivo grande, aeróbio, mesófilo, com flagelos peritríquios, e produtor de esporos que podem ser centrais ou subterminais [...]”, sendo sua temperatura de multiplicação de 10 a 48 °C. (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 42).

Duas formas distintas de gastroenterite são causadas por contaminação de *Bacillus Cereus*, a síndrome diarreica que tem como sintoma diarreia, dores abdominais, intensa vontade de evacuar, e em alguns poucos casos náuseas e vômito e a síndrome emética causa vômito, náuseas e mal estar em geral, podendo ocasionar também diarreia (*id bid*).

A contaminação dos alimentos por essa bactéria pode ocorrer quando o mesmo esteja sendo manuseado, processado, estocado ou até mesmo na distribuição e geralmente acontece por causa de um equipamento ou utensílio mal higienizados. Os alimentos que geralmente são contaminados por *B. Cereus* são: os cereais e derivados, produtos de laticínios, carnes, alimentos desidratados e especiarias (MENDES; COELHO; AZEVEDO, 2011).

2.5.2.4 *Estafilococos coagulase positiva*

Estafilococos coagulase positiva são bactérias gram-positivas, que quando vistas através do microscópio tem a característica de cacho de uva devido a sua capacidade de se dividirem em planos diferentes. (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 42).

Essas bactérias mesófilas crescem em temperaturas na faixa de 7° C à 47,8 °C, produzindo suas enterotoxinas, que são as toxinas que podem causar intoxicação alimentar, entre 10 °C e 45 °C, com um crescimento satisfatório entre 40 °C e 45 °C. (*id bid*).

O principal reservatório de *Estafilococos coagulase positiva* é o homem e os animais domésticos. Podendo transmiti-lo através da cavidade nasal, disseminando assim para outras partes do corpo, onde, na manipulação de alimentos, pode contaminá-los, através de feridas infectadas. (*id bid*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO REALIZADO

A investigação proposta, após rigoroso planejamento, caracterizou-se como de abordagem quantitativa com procedimento do tipo estudo de caso e sob nível explicativo. Na presente pesquisa, o “caso” estudado foram as “matérias-primas utilizadas em indústria alimentícia, com ou sem análises microbiológicas em seus laudos” para determinar se podem ou não serem apontadas como agentes biológicos aplicados no sistema HACCP.

Nesse tipo de procedimento, o objeto da pesquisa é isolado de agentes externos a ela para que não existam interferências e que os resultados sejam fidedignos. Yin (2001, p. 45) afirma que “o estudo de caso representa uma investigação empírica e compreende um método abrangente, com a lógica do planejamento, da coleta e da análise de dados. Pode incluir tantos estudos de caso único quanto de múltiplos, assim como abordagens quantitativas e qualitativas de pesquisa.

O nível, explicativo, determinado, deu-se em função da necessidade de descrição, manipulação e controle de variáveis para a pesquisa. Como variável independente apresentou-se a matéria-prima utilizada na indústria alimentícia e, as dependentes foram a presença ou ausência de laudos microbiológicos que indicariam se essas matérias-primas conteriam ou não agentes biológicos contaminantes.

A descrição, controle e manipulação das variáveis exigiu uma profunda revisão de literatura para que fosse possível determinar as possibilidades originadas das relações entre as mesmas. Os estudos de abordagem quantitativa requerem, sobretudo, a descrição minuciosa da investigação científica para, posteriormente, contribuir para a coerência dos resultados experimentais encontrados. Portanto, incorpora o caráter conceitual e analítico desenvolvido na investigação sendo estabelecida a importância da revisão de literatura:

A revisão bibliográfica é sempre útil para fazer comparações com outros casos semelhantes, buscar fundamentação teórica e também para reforçar a argumentação de quem está descrevendo o caso. A discussão permite avaliar os caminhos seguidos (como se desenvolve o caso), desde a elaboração dos objetivos (por que estudar o caso) até as conclusões (o que se aprendeu com o estudo do caso). (VENTURA, 2007, p. 132).

Pode-se afirmar que a adequada análise dos dados e discussão dos resultados apenas foi possível a partir da rigorosa e coerente revisão de literatura realizada.

A abordagem experimental originou a determinação de variáveis, independentes e dependentes e, a descrição das hipóteses parciais que foram refutadas e/ou confirmadas com o estudo. (GIL, 2002).

Elencou-se as seguintes hipóteses para o estudo:

- As matérias-primas com laudo microbiológico estão isentas de agentes biológicos contaminantes.
- As matérias-primas com laudo microbiológico não estão isentas de agentes biológicos contaminantes
- As matérias-primas sem laudo microbiológico estão isentas de agentes biológicos contaminantes.
- As matérias-primas sem laudo microbiológico não estão isentas de agentes biológicos contaminantes.

Após a determinação das hipóteses, buscou-se a relação entre as variáveis para a confirmação ou não das mesmas.

Toda a investigação foi efetuada em rigorosa sintonia com o problema da pesquisa e com o objetivo geral, previamente estabelecido. Após a delimitação adequada do problema a ser respondido, iniciou-se a investigação através da coleta de dados, sistemática análise destes e posterior discussão dos resultados obtidos. (NISBET; WATT, 1982).

A coleta de dados foi realizada através de artigos científicos analisados por especialistas e resgatados de bases científicas de dados, fornecidas pela universidade ou livres, disponíveis na rede de computadores. Outro instrumento foram as tabelas do Excel utilizadas para registro de apontamentos da pesquisa prática, além da observação direta da investigadora.

3.2 HISTÓRICO DO PROCESSO

3.2.1 Caracterização dos materiais selecionados a serem utilizados nos seguintes ensaios:

3.2.1.1 Ensaio para investigação de *Salmonella*

Tabela 2 - Materiais e equipamentos utilizados para análise de *Salmonella*

Materiais/Equipamentos	Condições/Utilização
Estufa bacteriológica	34 à 38°C
Água peptonada tamponada 1% (225 mL)	Para diluição da amostra
Caldo Muller Kauffman (10 mL)	Para enriquecimento seletivo da amostra
Lugol	Para diluição no caldo Muller Kauffman
Disco de novobiocina	Para diluição no caldo Muller Kauffman
Caldo Rappaport Vassilidis soja	Para enriquecimento seletivo da amostra
Placa de Petri com triplaca (ágar cromogênico, XLD, verde brilhante).	Para inoculação da amostra
Alça estéril	Para espalhar amostra na placa que contém meio de cultura seletivo

Fonte: da autora, 2019.

3.2.1.2 Ensaios para investigação de *Coliformes* e *Escherichia Coli*

Tabela 3 - Materiais e equipamentos utilizados para análise de *Coliformes* e *Escherichia Coli*

Materiais/Equipamentos	Condições/Utilização
Estufa bacteriológica	35°C
Água salina peptonada 0,1% (225 mL)	Para diluição (10^{-1}) da amostra
Água salina peptonada 0,1% (9 mL)	Para diluição (10^{-2}) e (10^{-3}) da amostra
Placa de Petri com ágar ECC cromogênico	Para inoculação da amostra
Alça Drigalski	Para espalhar amostra na placa que contém meio de cultura seletivo

Fonte: da autora, 2019.

3.2.1.3 Ensaios para investigação de *Bacillus Ceureus*

Tabela 4 - Materiais e equipamentos utilizados para análise de *B. Cereus*

Materiais/Equipamentos	Condições/Utilização
Estufa bacteriológica	35°C
Água salina peptonada 0,1% (225 mL)	Para diluição (10^{-1}) da amostra

Água salina peptonada 0,1% (9 mL)	Para diluição (10^{-2}) e (10^{-3}) da amostra
Placa de Petri com ágar MYP	Para inoculação da amostra
Alça Drigalski	Para espalhar amostra na placa que contém meio de cultura seletivo

Fonte: da autora, 2019.

Caso ocorra o crescimento de alguma colônia típica utiliza-se também:

- Ágar sangue ISO.

3.2.1.4 Ensaios para investigação de *Estafilococos coagulase positiva*

Tabela 5 - Materiais e equipamentos utilizados para análises de *Estafilococos coagulase positiva*

Materiais/Equipamentos	Condições/Utilização
Estufa bacteriológica	35°C
Água salina peptonada 0,1% (225 mL)	Para diluição (10^{-1}) da amostra
Água salina peptonada 0,1% (9 mL)	Para diluição (10^{-2}) e (10^{-3}) da amostra
Placa de Petri com ágar Baird-Parker	Para inoculação da amostra
Alça Drigalski	Para espalhar amostra na placa que contém meio de cultura seletivo

Fonte: da autora, 2019.

Caso ocorra o crescimento de alguma colônia típica utiliza-se também:

- Caldo infuso cérebro coração (BHI);
- Plasma de coelho com EDTA.

3.2.2 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas com placas de petri já preparadas, fornecidas por uma empresa externa, as quais são utilizadas para detectar e quantificar os microrganismos em ambientes, alimentos e matérias-primas. Além de fornecer os meios de cultura prontos, esta empresa fornecedora de materiais para microbiologia oferece toda metodologia para as análises microbiológicas, baseadas nas seguintes normas: ISO 16649-2

para *Coliformes termotolerantes* (AFNOR, 2001), através da identificação de *Escherichia Coli*, ISO 6888-1 para *Estafilococos coagulase positiva* (SILVA *et al.*, 2017), ISO 7932 para *B. Cereus* e a ISO 6579 para *Salmonella*. (SILVA *et al.*, 2010).

Antes da realização de todas as análises, a analista paramentou-se com toca, máscara e luvas descartáveis, higienizando as mãos com solução de detergente e álcool 70%. Após, foi desinfetada toda a sala e a capela de fluxo laminar com álcool 70%, onde seriam realizadas as análises, isso para minimizar os riscos de contaminação da amostra e não interferir nos resultados finais.

Para as análises de *Coliformes* e *Escherichia Coli*, *Bacillus Cereus* e *Estafilococos coagulase positiva*, a inoculação da amostra nas placas foi feita com a diluição de 25 g da amostra a ser analisada em 225 mL de água salina peptonada 0,1 % estéril, sendo esta a diluição (10^{-1}). Após essa diluição, foram transferidos 1 mL para um tubo de água salina peptonada 0,1 % de 9 mL, para se obter a diluição (10^{-2}) de onde foi retirada a diluição (10^{-3}). Já para análise de *Salmonella*, foram diluídas 25 g da amostra em água peptonada tamponada 1 % e incubadas em caldos específicos para enriquecimento. (SILVA *et al.*, 2010).

Todas as análises das matérias-primas selecionadas foram realizadas em triplicata, exceto na análise de *Salmonella*, onde a diluição foi feita apenas uma vez, devido ao custo e a quantidade do meio diluente e de cultura disponível, porém, semeando-as no enriquecimento seletivo em triplicata.

3.2.2.1 *Salmonella*

Para análise microbiológica da *Salmonella*, utilizou-se as placas de petri Triplaca, que é composta de três tipos de ágar, XLD, ágar cromogênico para *Salmonella* e verde brilhante. No ágar XLD as colônias se apresentam com a coloração rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente ao redor. Já no ágar cromogênico para *Salmonella*, as colônias se apresentam na coloração magenta e no ágar verde brilhante as colônias são opacas, róseas, lisas, com bordas perfeitas e rodeadas por um halo vermelho.

Após a diluição de 25 g da amostra em 225 mL água peptonada tamponada 1 %, a amostra foi incubada em estufa a temperatura de 34 a 38 °C por 18 horas. Após este período, transferiu-se 1 mL desta diluição para um tubo contendo 10 mL de caldo Muller Kauffman contendo 0,2 mL de lugol e um disco de novobiocina e incubou-se novamente em estufa a temperatura de 37 ± 1 °C por mais 24 horas. Da mesma forma, da primeira diluição foram

transferidos 0,1 mL para um tubo de 10 mL de contendo caldo Rappaport Vassilidis soja que foi incubado a temperatura de $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por mais 24 horas.

Passada a segunda etapa de incubação de enriquecimento seletivo, transferiu-se uma alçada de cada tubo para placa de petri triplaca para *Salmonella*. que foram incubadas em estufa a uma temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

3.2.2.2 Coliformes e *Escherichia Coli*

Para análise de *Coliformes e Escherichia Coli* em meio cromogênico, utilizou-se as placas de Petri de ágar ECC cromogênico que é um meio de cultura que contém triptone, bile e substratos cromogênicos para glucuronidase e galactosidase selecionados para propiciar o crescimento de *Coliformes e Escherichia Coli*. Estes são utilizados para semeadura primária que permite a identificação presuntiva e enumeração. Quando formadas as colônias de *Coliformes* se apresentam com coloração rósea e as colônias de *Escherichia Coli* se apresentam com a cor azul escuro. A amostra foi diluída conforme a sessão 3.2.2, em seguida, transferiu-se 0,1 mL de cada diluição nas placas de ECC cromogênico, espalhadas por toda placa com alça drigalski e incubadas em estufa à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 à 24 horas.

Caso ocorra contagem de colônias nas placas, deve-se escolher aquelas que tenham de 10 a 300 colônias, multiplicar pelo fator de diluição e calcular a média aritmética do número de colônias/g. Os resultados devem ser expressos em UFC/g de amostra, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$N = \frac{\Sigma c}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Onde:

Σc = soma das colônias contadas nas duas placas a partir de duas diluições sucessivas, pelo menos uma das placas deve conter 15 colônias;

n_1 = número de placas utilizadas na primeira diluição;

V = volume de inóculo em cada placa;

n_2 = número de placas utilizada na segunda diluição ;

d = diluição correspondente à primeira diluição utilizada.

3.2.2.3 *Bacillus Ceureus*

Para análise de *B. Cereus*, foram utilizadas placas de petri com ágar MYP. Sendo o *B. Cereus* tipicamente manitol negativo, no ágar MYP, ele forma colônias róseo-avermelhadas e lecitinase positivo, formando um halo opaco ao redor das colônias devido à presença de Egg Yolk no meio. Inibindo o crescimento de muitas outras bactérias devido a presença de polimixina B no meio. (SILVA *et al.*, 2010).

Primeiramente a diluição da amostra foi feita conforme sessão 3.2.2, em seguida, transferiu-se 0,1 mL de cada diluição nas placas de ágar MYP, espalhadas por toda placa com a alça drigalski e incubadas à 30 ± 1 °C por 18 à 24 horas.

Caso ocorra contagem de colônias, deve-se selecionar as placas que contenham de 15 à 150 colônias típicas. Escolher no mínimo 5 colônias típicas e 5 colônias atípicas para submeter ao teste da verificação de atividade hemolítica inoculando as colônias separadamente em ágar Sangue ISO por estria por picada, incubando-as à temperatura de 30 ± 1 °C por 24 horas. Observar se há formação de um halo transparente de hemólise ao redor da área inoculada.

Os cálculos devem ser feitos considerando todas as colônias que apresentaram resposta positiva para a prova de hemólise, calculando proporcionalmente o número de colônias obtidas em razão do número de colônias testadas. Após a identificação deve-se realizar o seguinte cálculo:

$$\alpha = \frac{b}{A} \cdot C$$

Onde:

b = número de colônias típicas confirmadas;

A = número de colônias típicas submetidas a confirmação;

C = número total de colônias típicas presentes na placa.

Depois, deve-se calcular o número de *B. Cereus*, aplicando a seguinte fórmula:

$$N = \frac{\sum \alpha}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Onde:

$\sum \alpha$ = soma das colônias de *B. Cereus* positiva em todas as placas;

n_1 = número de placas contadas na primeira diluição;

V = volume de inoculo em cada placa;

n₂ = número de placas contadas na segunda diluição ;

d = diluição correspondente à primeira diluição utilizada.

3.2.2.4 *Estafilococos Coagulase Positiva*

Para análise de *Estafilococos coagulase positiva*, foram utilizadas placas de petri com ágar Baird-Parker, que combina telurito de potássio (0,01 %), a glicina (1,2 %) e o cloreto de lítio (0,5 %) como agentes seletivos. Contêm também 1 % de piruvato de sódio para evitar o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Se formadas as colônias de *Estafilococos coagulase positiva* se apresentam na cor preta devido a presença de telurito de potássio com a formação de halos em torno da colônia formado pela lecitina da gema de ovo. (SILVA et al., 2010).

Primeiramente, a diluição da amostra foi feita conforme sessão 3.2.2, em seguida, transferiu-se 0,1 mL de cada diluição nas placas de ágar Baird-Parker, espalhadas por toda placa com a alça drigalski e incubadas à 35 ± 1 °C por 48 horas.

Caso ocorra contagem de colônias, deve-se selecionar aquelas placas que contenham de 15 a 300 colônias típicas e/ou atípicas e contá-las isoladamente para fazer o teste de confirmação. Para este teste é preciso selecionar 5 colônias típicas e 5 colônias atípicas de cada placa, isolá-las separadamente em tubos contendo caldo infuso Cérebro Coração (BHI) e incubá-los em estufa à 35 ± 1 °C por 24 horas e após, submete-las ao teste da coagulase.

Após 24 horas de incubação, deve-se transferir 0,2 mL de cada cultura obtida nos tubos de BHI para tubos estéreis e adicionar 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA, misturando em movimentos circulares, sem agitar os tubos, para não interferir na coagulação. Incubar em estufa à temperatura de 35 à 37 °C e observar a formação de coágulos entre 4 a 6 horas, caso não forme nenhum coagulo incubar por mais 24 horas. O teste confirma coagulase positiva ao se verificar a formação de coágulos. Os resultados devem ser expressos em UFC/g ou mL, seguindo as seguintes fórmulas:

Primeiramente, deve-se calcular o número α *Estafilococos coagulase positiva* em cada placa:

$$\alpha = \frac{bc}{Ac} \cdot Cc + \frac{bnc}{Anc} \cdot Cnc$$

Onde:

b_c = nº de colônias típicas confirmadas coagulase positiva;

A_c = nº de colônias típicas submetidas ao teste da coagulase;

C_c = nº total de colônias típicas encontradas na placa;

b_{nc} = nº de colônias atípicas confirmadas coagulase positiva;

A_{nc} = nº de colônias atípicas submetidas ao teste da coagulase;

C_{nc} = nº total de colônias atípicas encontradas na placa.

Depois deve-se calcular o N, conforme a seguinte fórmula, que identifica *Estafilococos coagulase positiva* na amostra.

$$N = \frac{\Sigma_c}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Onde:

Σ_c = soma das colônias de *Estafilococos* coagulase positiva em todas as placas;

n_1 = número de placas selecionadas na primeira diluição;

V = volume de inoculo em cada placa;

n_2 = número de placas selecionadas na segunda diluição ;

d = diluição correspondente à primeira diluição utilizada.

3.3 ANÁLISE DOS DADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no período de uma semana, sendo realizado cada ensaio para cada amostra em triplicata, para confiabilidade de cada resultado.

Inicialmente foram coletadas 200g de cada uma das amostra de matérias-primas. As amostras sólidas foram coletadas em sacos plásticos estéreis e a amostra líquida em frasco de 500 mL de politereftalato de etileno (PET), seguindo as condições de higiene utilizada na área de pesagem da empresa em questão, considerada área limpa.

A legislação engloba a análise microbiológica dos alimentos na forma de produto final, isentando a análise das matérias-primas, desde que elas estejam identificadas, proibindo seu consumo *in natura*. Porém, as análises das matérias-primas foram realizadas baseando-se nos limites desta legislação e caracterizando as amostras como “amostras indicativas”,

considerando que, caso alguma dessas matérias-primas encontre-se contaminada, poderá contaminar o produto final, o deixando fora das especificações exigidas na RDC nº 12. (BRASIL, 2019).

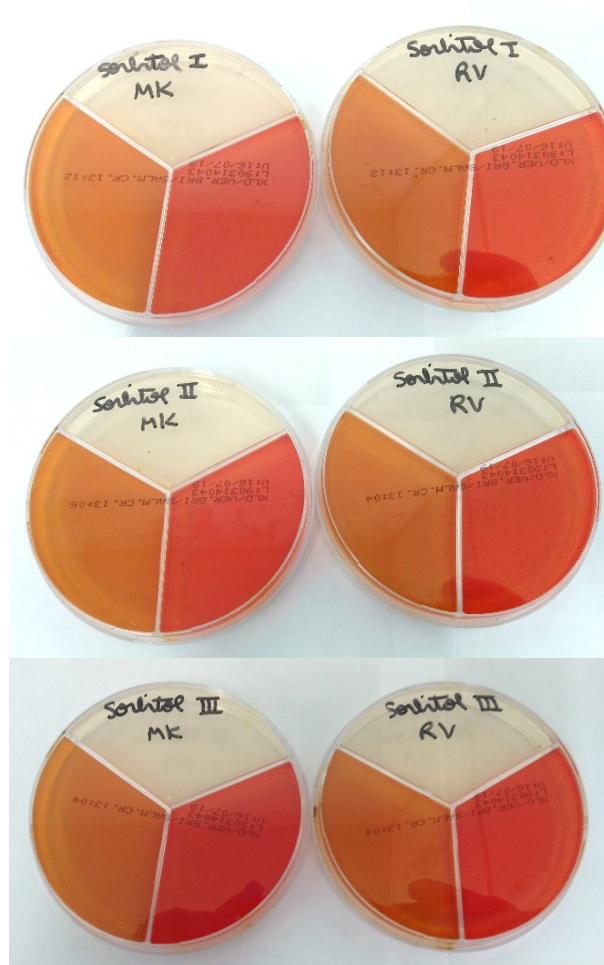
3.3.1 Análises microbiológica da matéria-prima selecionada

Para o sorbitol, foram realizadas as análises microbiológicas a seguir:

3.3.1.1 Ensaios para investigação de *Salmonella*

Na investigação de *Salmonella* nesta matéria-prima foram obtidos os resultados apresentados na figura 1:

Figura 1 - Investigação de *Salmonella* no sorbitol



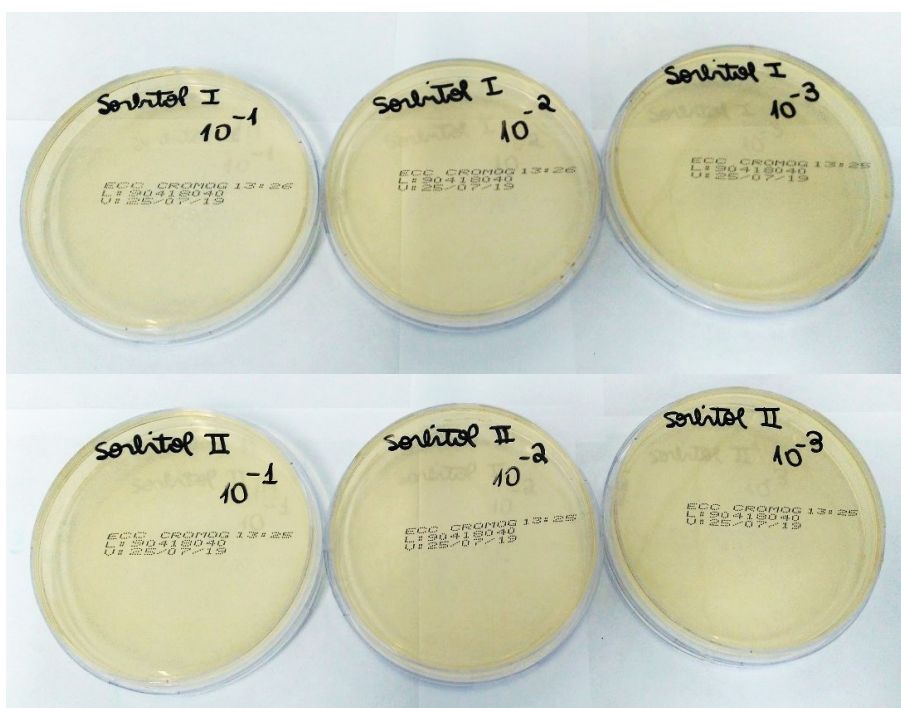
Fonte: da autora, 2019.

Nestes três ensaios não foi observado nenhum surgimento de unidade formadora de colônia. Como a legislação estabelece que a contagem de *Salmonella* deve ser ausente para suplementos vitamínicos, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtido estão dentro do padrões exigidos.

3.3.1.2 Ensaios para investigação de Coliforme e *Escherichia coli*

Conforme justificado na sessão 3.2.2.2, foram realizadas análises para *Coliformes totais* e *Escherichia Coli*, considerando que os *Coliformes* termotolerantes, também chamados de *Coliformes fecais*, são um subgrupo dos *Coliformes totais* e segundo Franco e Landgraf (2008), quando se é verificado a presença de *E.Coli* em uma amostra, considera-se um indicativo de contaminação microbiana de origem fecal. Na análise da matéria-prima sorbitol foram obtidos os resultados apresentados na figura 2:

Figura 2 - Investigação de *Coliformes* e *Escherichia Coli* no sorbitol





Fonte: da autora, 2019.

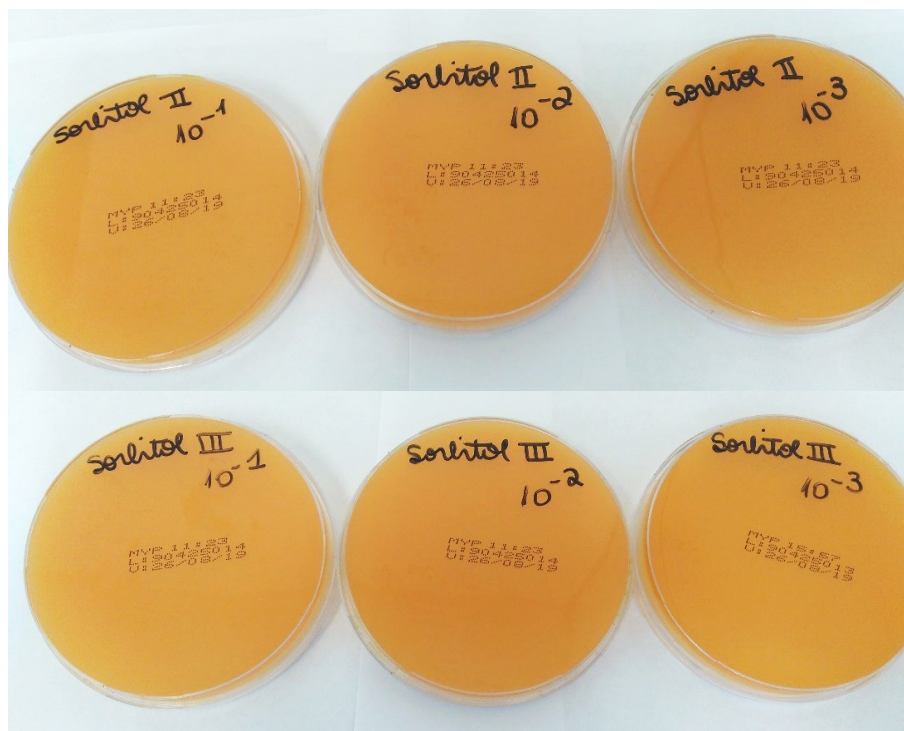
Nestas análises não foram observados nenhum surgimento de unidade formadora de colônia. Como a legislação estabelece que a contagem de *Coliformes a 45 °C* deve ser 10 UFC/g para suplementos vitamínicos e as análises foram realizadas para *Coliformes Totais* e *E. Coli*, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtido estão dentro do padrões exigidos.

3.3.1.3 Ensaios para investigação de *Bacillus Cereus*

Para a investigação de *B. Cereus*, obteve-se os resultados apresentados na figura 3:

Figura 3 - Investigação de *B. Cereus* no Sorbitol





Fonte: da autora, 2019.

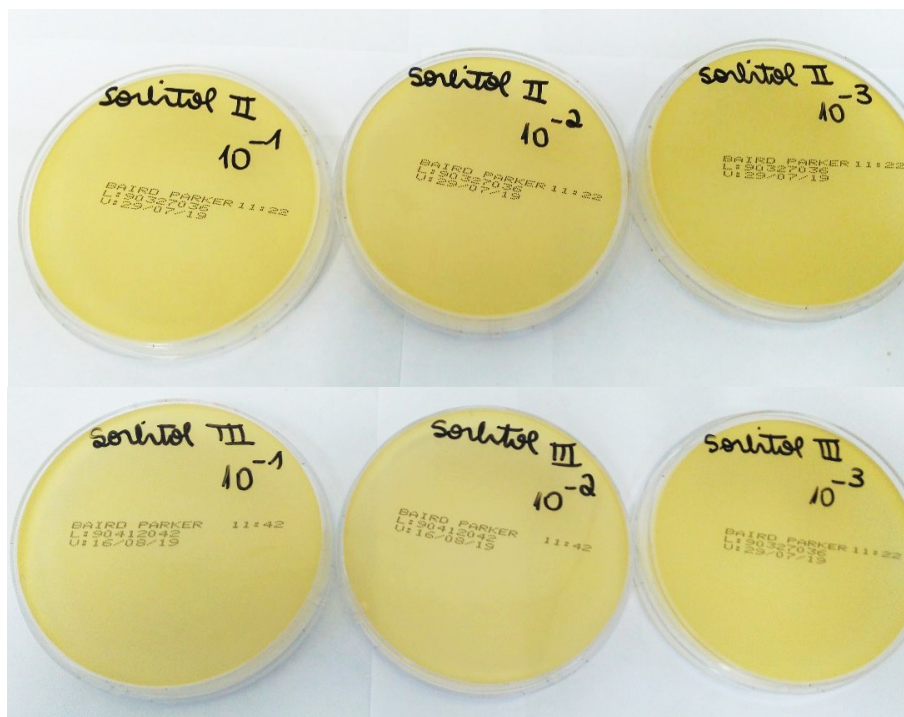
Nestes ensaios foram observado nenhum surgimento de unidade formadora de colônia. Como a legislação estabelece que a contagem de *B. Cereus* deve ser de 5×10^2 UFC/g para suplementos vitamínicos, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtido estão de acordo com a legislação.

3.3.1.4 Ensaios para investigação de *Estafilococos Coagulase Positiva*

Os resultados para a análise da investigação de *Estafilococos coagulase positiva* estão apresentados na figura 4:

Figura 4 – Investigação de *Estafilococos coagulase positiva* no sorbitol





Fonte: da autora, 2019.

Não foi observado nenhum surgimento de unidade formadora de colônia nas análises realizadas. Como a legislação estabelece que a contagem de *Estafilococos coagulase positiva* deve ser de 5×10^2 UFC/g para suplementos vitamínicos, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtido estão dentro do padrões exigidos.

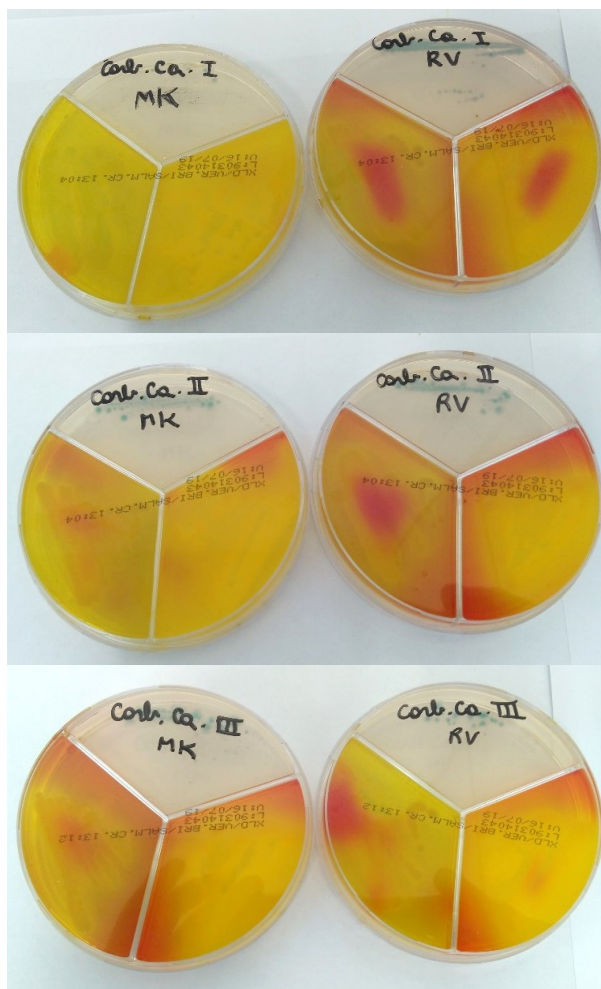
3.3.2 Análises microbiológicas da matéria-prima selecionada

Para o carbonato de cálcio foram feitos os seguintes ensaios:

3.3.2.1 Ensaios para investigação de *Salmonella*

Na análise da matéria-prima carbonato de cálcio para investigação de *Salmonella* foram obtidos os resultados apresentados na figura 5:

Figura 5 – Investigação de *Salmonella* no carbonato de cálcio



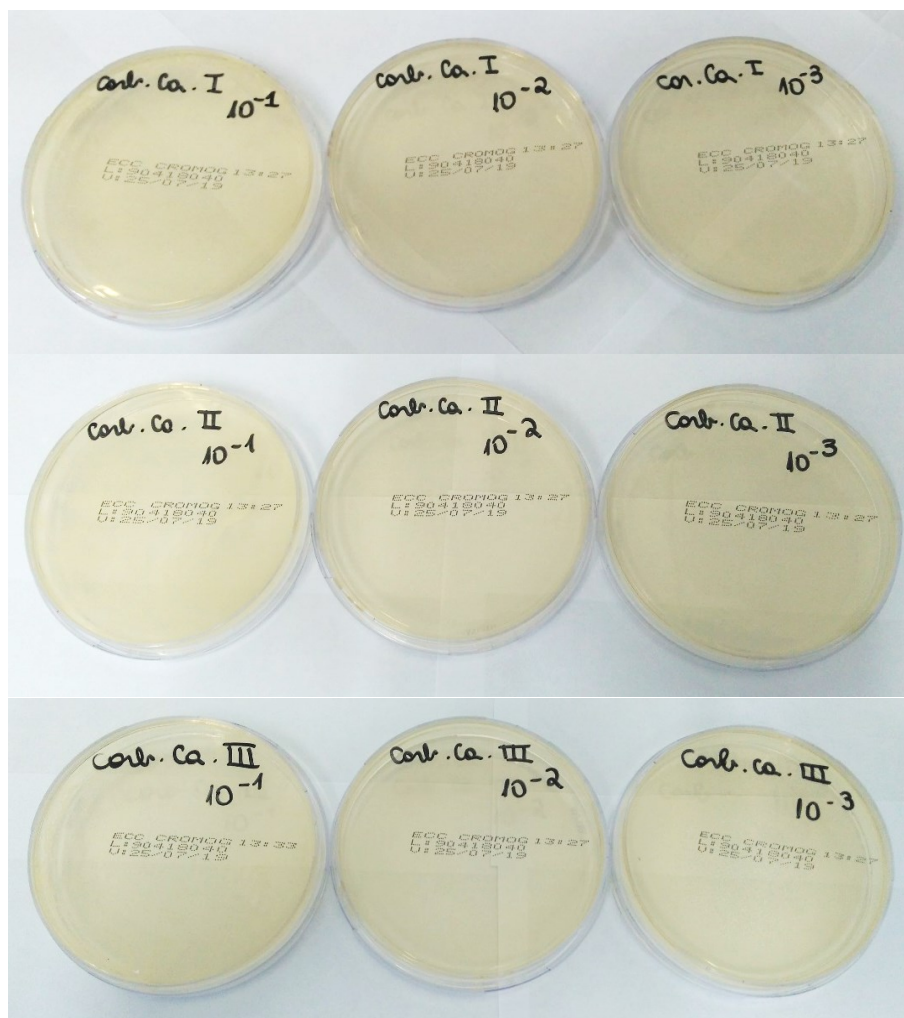
Fonte: da autora, 2019.

Nesses ensaios, foram observados o surgimento de algumas colônias. Porém segundo a literatura, as mesmas não são consideradas colônias características de *Salmonella*. Devido a isso, não houve a necessidade da confirmação das colônias. Como a legislação estabelece que a contagem de *Salmonella* deve ser ausente para suplementos vitamínicos, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtido estão dentro do padrões exigidos. O crescimento de colônias não características de *Salmonella*, deixa em aberto, a possibilidade de uma futura investigação, para verificação de qual microrganismo pode ter crescido no meio de cultura em questão.

3.3.2.2 Ensaio para investigação de Coliformes e *Escherichia Coli*

Na análise do carbonato de cálcio para investigação de *Coliformes Totais* e *E. Coli* foram obtidos os seguintes resultados (Figura 6):

Figura 6 – Investigação de *Coliformes* e *Escherichia Coli* no carbonato de cálcio



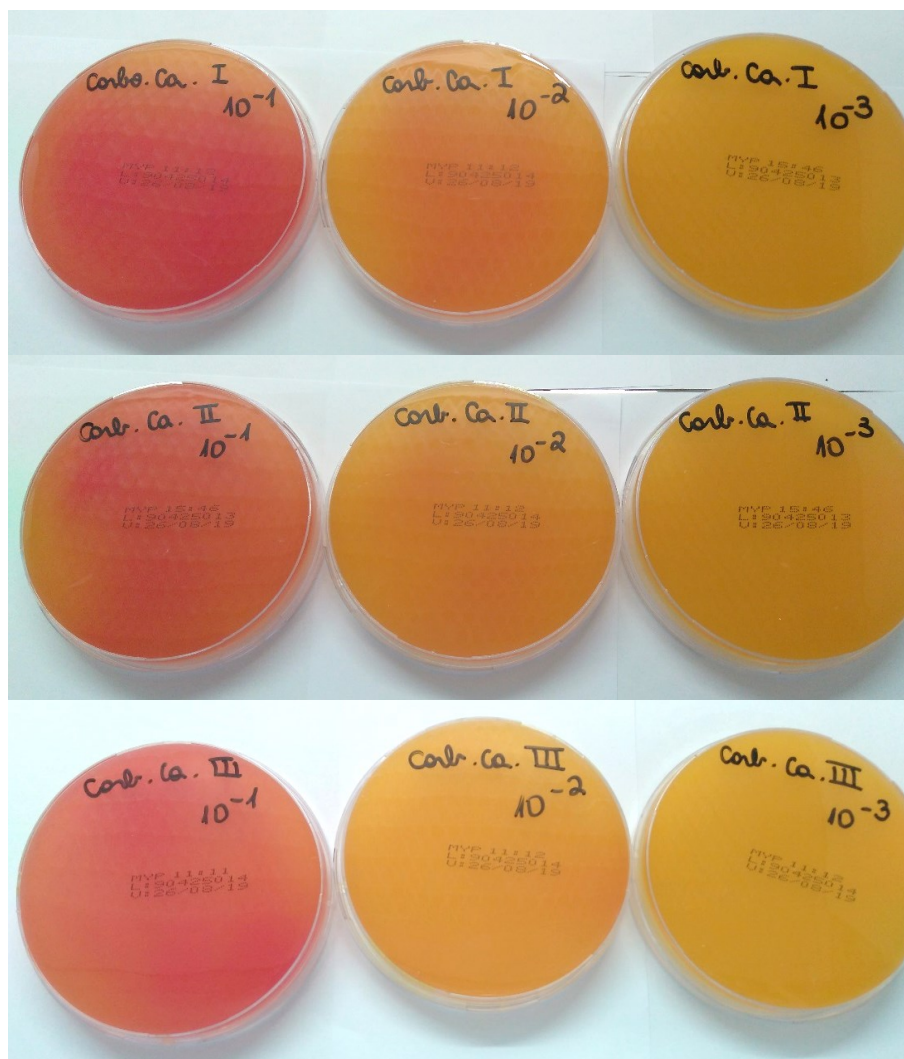
Fonte: da autora, 2019.

Nas análises realizadas, não foi observado nenhum surgimento de unidade formadora de colônia. Como a legislação estabelece que a contagem de *Coliformes* a 45 °C deve ser 10 UFC/g para suplementos vitamínicos e as análises foram realizadas para *Coliformes Totais* e *Escherichia Coli*, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtidos estão dentro do padrões exigidos para segurança alimentar.

3.3.2.3 Ensaios para investigação de *Bacillus Cereus*

Para a análise do carbonato de cálcio na investigação de *B. Cereus* foram obtidos os resultados (Figura 7):

Figura 7 – Investigação de *B. Cereus* no carbonato de cálcio



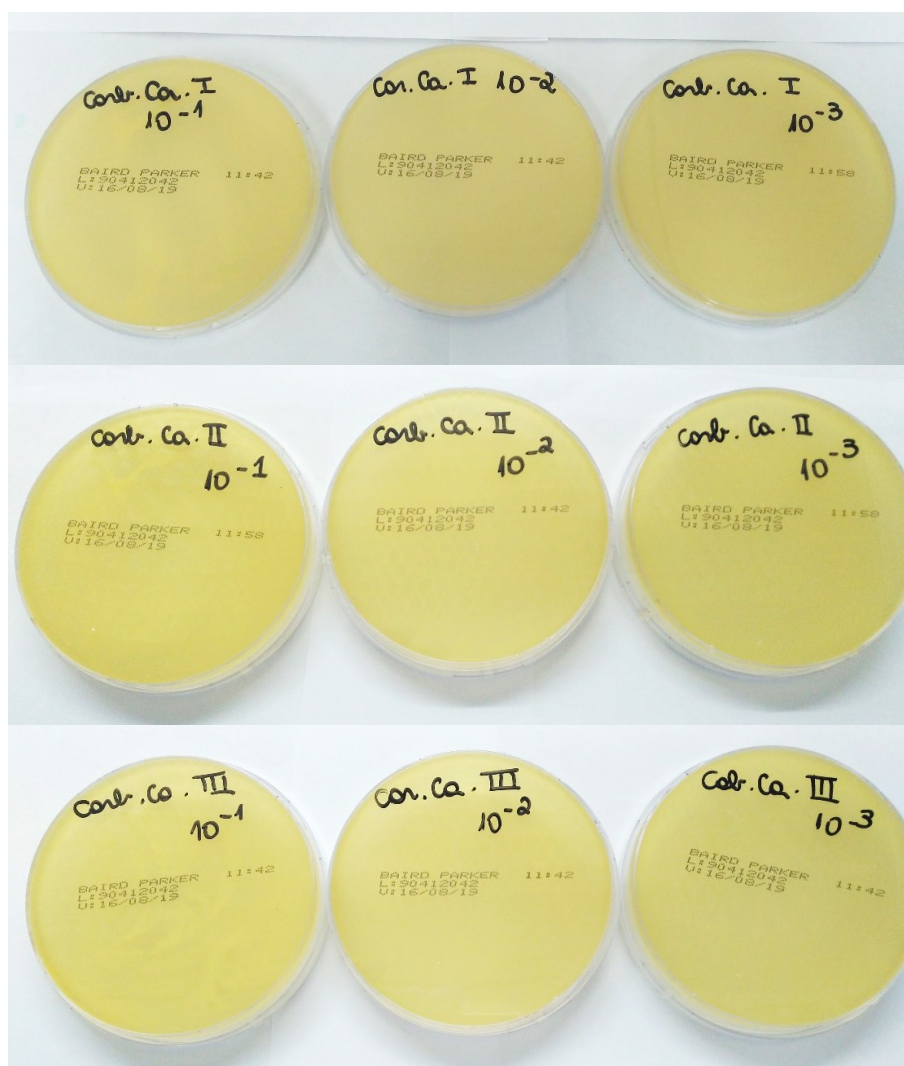
Fonte: da autora, 2019.

Como pode ser observado, não houve nenhum surgimento de unidade formadora de colônia nas análises realizadas. O ágar MYP teve sua coloração levemente alterada em algumas diluições, porém, nada característico e os pontos esbranquiçados visíveis em algumas placas ocorreram devido à diluição da amostra na água salina peptonada 0,1%. Como a legislação estabelece que a contagem de *B. Cereus* deve ser de 5×10^2 UFC/g para suplementos vitamínicos, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtido estão dentro do padrões exigidos para segurança alimentar.

3.3.2.4 Ensaio para investigação de *Estafilococos Coagulase Positiva*

Na análise do carbonato de cálcio para investigação de *Estafilococos coagulase positiva*, foram obtidos os resultados da figura 8:

Figura 8 – Investigação de *Estafilococos coagulase Positiva* no carbonato de cálcio



Fonte: da autora, 2019.

Conforme observado, não houve nenhum surgimento de unidade formadora de colônia. Somente foram observados alguns pontos esbranquiçados nas placas, porém, devido a diluição da amostra na água salina peptonada 0,1%. Como a legislação estabelece que a contagem de *Estafilococos coagulase positiva* deve ser de 5×10^2 UFC/g para suplementos vitamínicos e de acordo com os limites deste produto, os resultados mostraram-se satisfatórios.

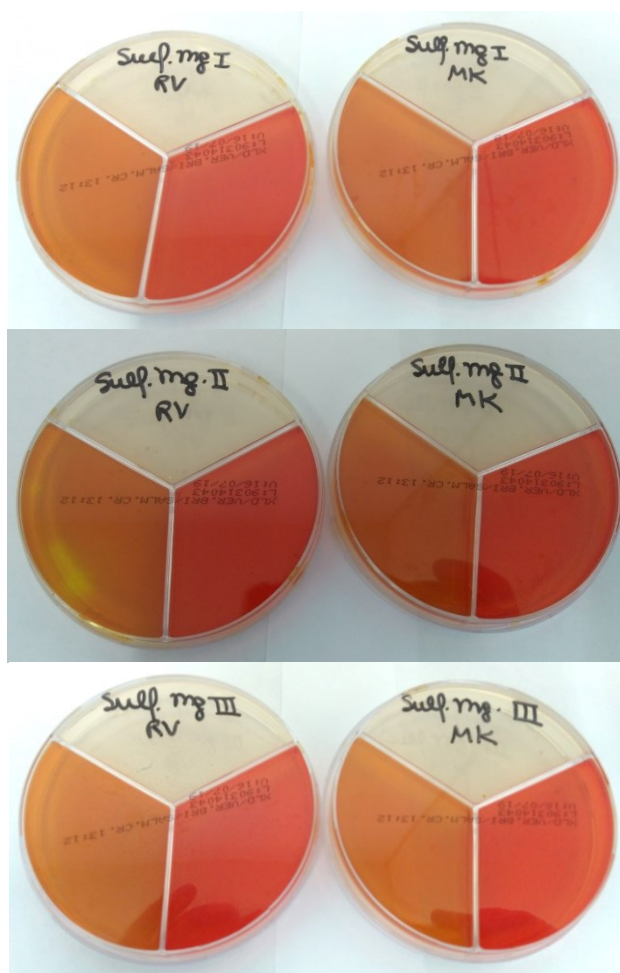
3.3.3 Análise microbiológica da matéria-prima selecionada

Para o sulfato de magnésio foram realizados os ensaios microbiológicos a seguir:

3.3.3.1 Ensaios para investigação de *Salmonella*

Para analisar o sulfato de magnésio na investigação de *Salmonella* obteve-se os resultados segundo a figura 9:

Figura 9 – Investigação de *Salmonella* no sulfato de magnésio



Fonte: da autora, 2019.

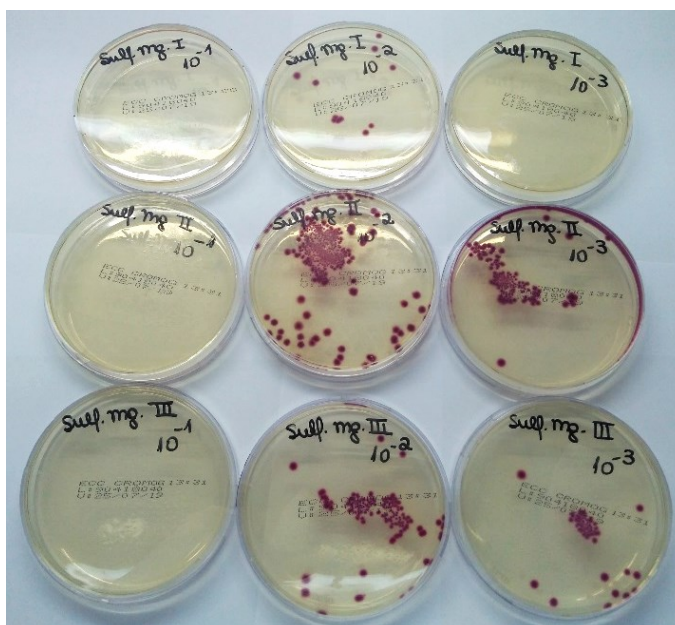
Nestas análises foram observadas o surgimento de algumas colônias. Porém segundo a bibliografia, não são consideradas colônias características para *Salmonella*. Devido a isso, não houve a necessidade da confirmação das colônias, conforme descrito na metodologia. Segundo a legislação, a contagem de *Salmonella* deve ser ausente para

suplementos vitamínicos, desta forma, os resultados obtido na análise do sulfato de magnésio está dentro dos padrões exigidos. O crescimento de colônias não características de *Salmonella*, deixa em aberto, a possibilidade de uma futura investigação, para verificação de qual microrganismo pode ter crescido no meio de cultura em questão.

3.3.3.2 Ensaio para investigação de Coliformes e *Escherichia Coli*

Para a análise do sulfato de magnésio para a investigação de *Coliformes Totais* e *E. Coli* foram obtidos os resultados apresentados na figura 10:

Figura 10 – Investigação de *Coliformes* e *Escherichia Coli* no sulfato de magnésio



Fonte: da autora, 2019.

Ao realizar a análise em triplicata, observou-se o surgimento de colônias características de coliformes, que conforme observado nas imagens anteriores, foram consideradas incontáveis, devido a aglomeração de colônias.

Figura 11 - Reanálise para confirmação de *Coliformes* e *Escherichia Coli*



Fonte: da autora, 2019.

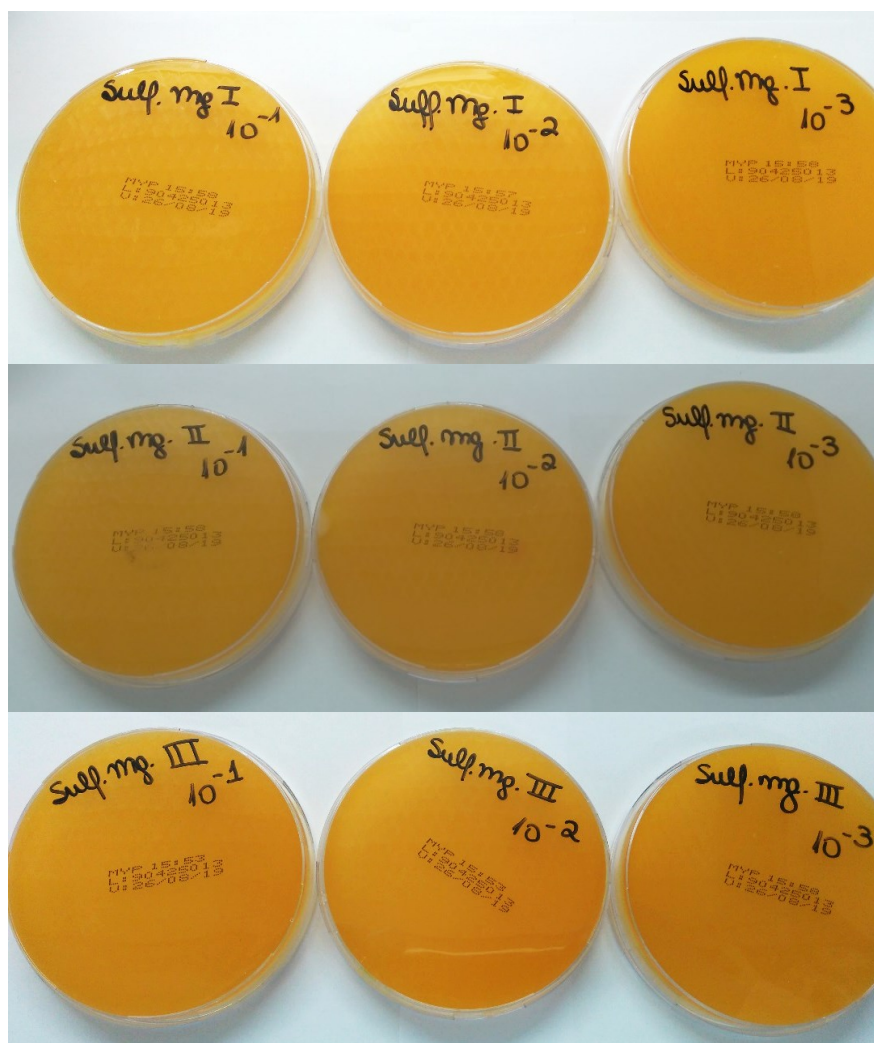
Considerando que as análises foram realizadas em triplicata, foi realizada uma quarta análise, apresentada na figura 11, que, após a incubação, conforme estabelecido pela metodologia, não detectou nenhuma unidade formadora de colônia, conforme imagem anterior. Na semana em que a amostra foi submetida à reanálise, houve incidência de temporais na região e a empresa sofreu com algumas quedas de energia, podendo ter interferido nas análises, já que a temperatura da estufa pode ter oscilado. Ainda desta forma, foram encaminhadas amostras desta matéria-prima, para laboratório de análises microbiológicas externo, para submeter a amostra a mais uma confirmação, dando resultado negativo para *Coliformes termotolerantes*.

Como a legislação estabelece que a contagem de *Coliformes a 45 °C* deve ser 10 UFC/g para suplementos vitamínicos e as análises foram realizadas para *Coliformes Totais* e *E. Coli*, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtido estão dentro do padrões exigidos. Porém devido a incidência de crescimento de unidades formadoras de colônias em um primeiro momento, levantou-se outras questões que posteriormente poderão ser investigadas.

3.3.3.3 Ensaio para investigação de *Bacillus Cereus*

Para a investigação de *B. Cereus*, foram obtidos os resultados da figura 12:

Figura 12 – Investigação de *B. Cereus* no sulfato de magnésio



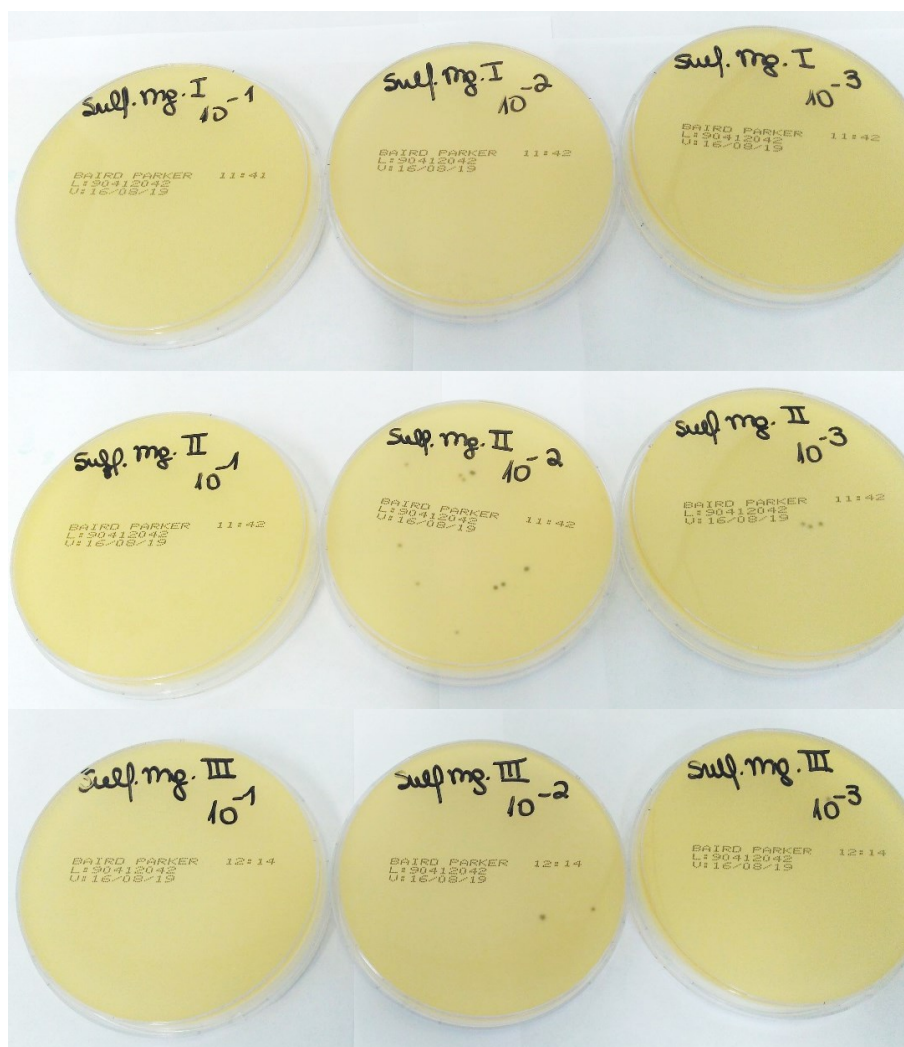
Fonte: da autora, 2019.

Não observou-se o surgimento de unidade formadora de colônia nas análises realizadas. Como a legislação estabelece que a contagem de *B. Cereus* deve ser de 5×10^2 UFC/g para suplementos vitamínicos, baseando-se nos limites deste produto, obteve-se resultados favoráveis segundo a legislação.

3.3.3.4 Ensaios para investigação de *Estafilococos Coagulase Positiva*

Para a análise do sulfato de magnésio para a investigação de *Estafilococos coagulase positiva* foram obtidos os seguintes resultados apresentados na figura 13:

Figura 13 – Investigação de *Estafilococos coagulase positiva* do sulfato de magnésio



Fonte: da autora, 2019.

Nesses ensaios foram observados que, em algumas placas, cresceram algumas colônias atípicas, que são aquelas muito parecidas com as colônias de *Estafilococos coagulase positiva*, porém não são essas bactérias. A literatura fala sobre a realização de um teste para confirmação que deve ser realizado tanto para colônias típicas, quanto para atípicas, quando forem observadas de 15 a 300 colônias, não sendo o caso da amostra em questão, onde foram observadas no máximo 10 colônias. Desta forma, como a legislação estabelece que a contagem de *Estafilococos coagulase positiva* deve ser de 5×10^2 UFC/g para suplementos vitamínicos, baseando-se nos limites deste produto, os resultados obtido estão dentro do padrões exigidos, pois as UFC/g encontradas não são características.

3.3.4 Análises microbiológicas da matéria-prima selecionada

A seguir estão descritos os ensaios microbiológicos realizados para análise da maltodextrina.

3.3.4.1 Ensaio para investigação de *Salmonella*

Na análise da maltodextrina para a investigação de *Salmonella* obteve-se os resultados mostrados na figura 14:

Figura 14 – Investigação de *Salmonella* na amostra de maltodextrina



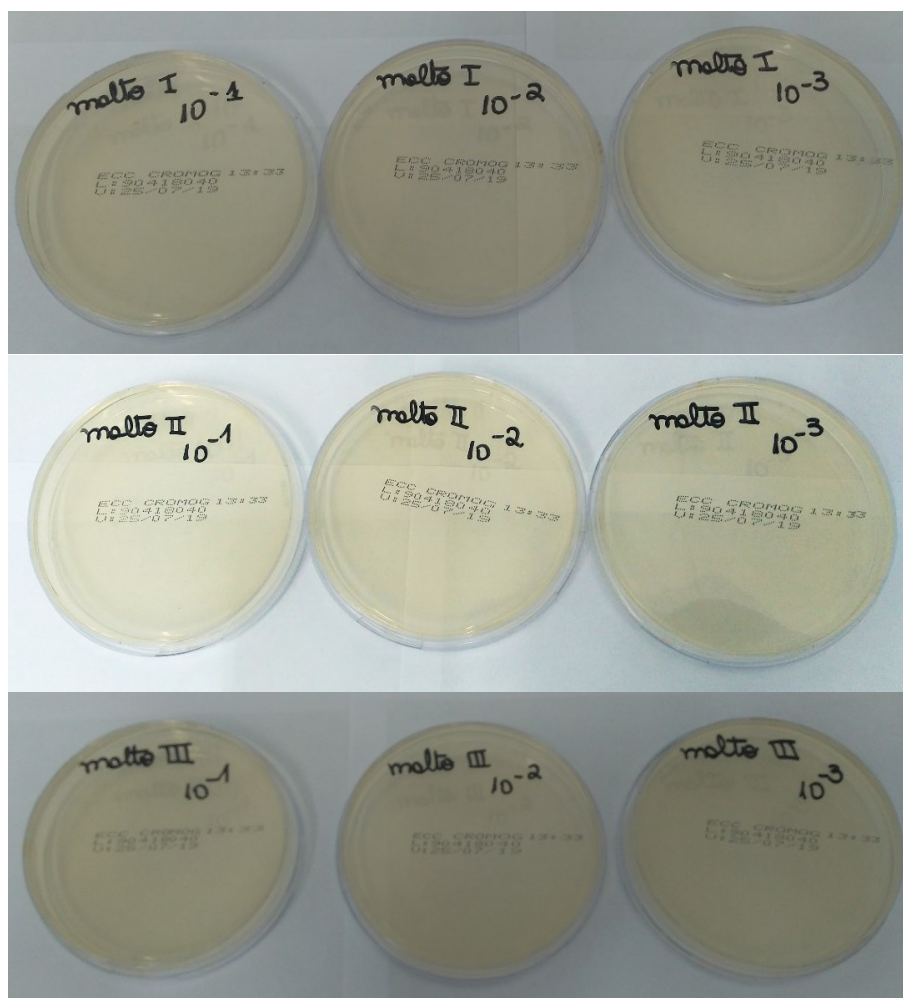
Fonte: da autora, 2019.

Nestas análises foram observadas o surgimento de algumas colônias. Porém, segundo a bibliografia, as mesmas não são consideradas colônias características de *Salmonella*. A legislação estabelece que a contagem de *Salmonella* deve ser ausente para suplementos vitamínicos. Baseando-se nestes limites, obteve-se resultados adequados segundo os padrões exigidos. O crescimento de colônias não características de *Salmonella*, deixa em aberto, a possibilidade de uma futura investigação, para verificação de qual microrganismos podem ter crescido no meio de cultura em questão.

3.3.4.2 Ensaios para investigação de Coliformes e *Escherichia Coli*

Para a análise da maltodextrina para a investigação de *Coliformes Totais* e *E. Coli* os resultados são apresentados na figura 15:

Figura 15 – Investigação de *Coliformes* e *E. Coli* na maltodextrina



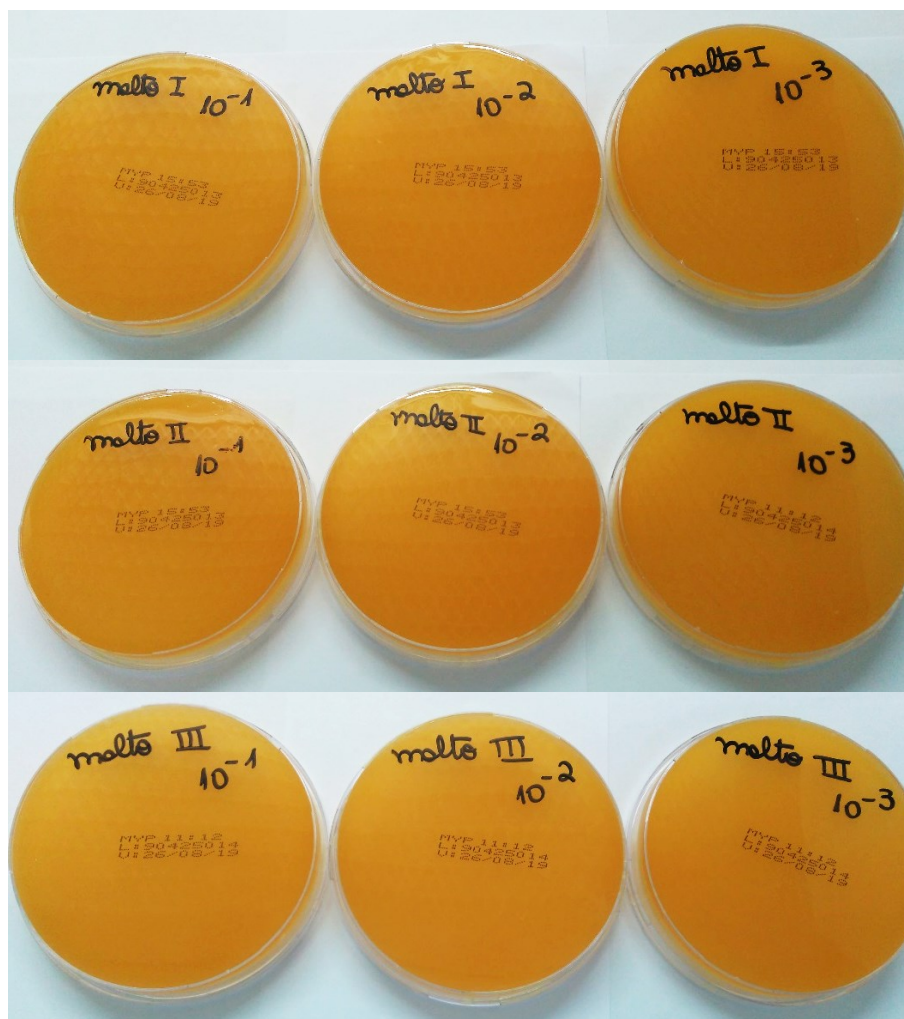
Fonte: da autora, 2019.

Neste ensaio não foi observado surgimento de colônia de *Coliformes* e *Escherichia Coli*. Para *Coliformes* a 45 °C, a legislação estabelece a presença de 10 UFC/g para suplementos vitamínicos. Neste sentido, os resultados estão em conformidade com os padrões de segurança exigidas.

3.3.4.3 Ensaio para investigação de *Bacillus Cereus*

A análise da maltodextrina para investigação de *B. Cereus* estão apresentadas na figura 16:

Figura 16 – Investigação de *B. Cereus* na maltodextrina



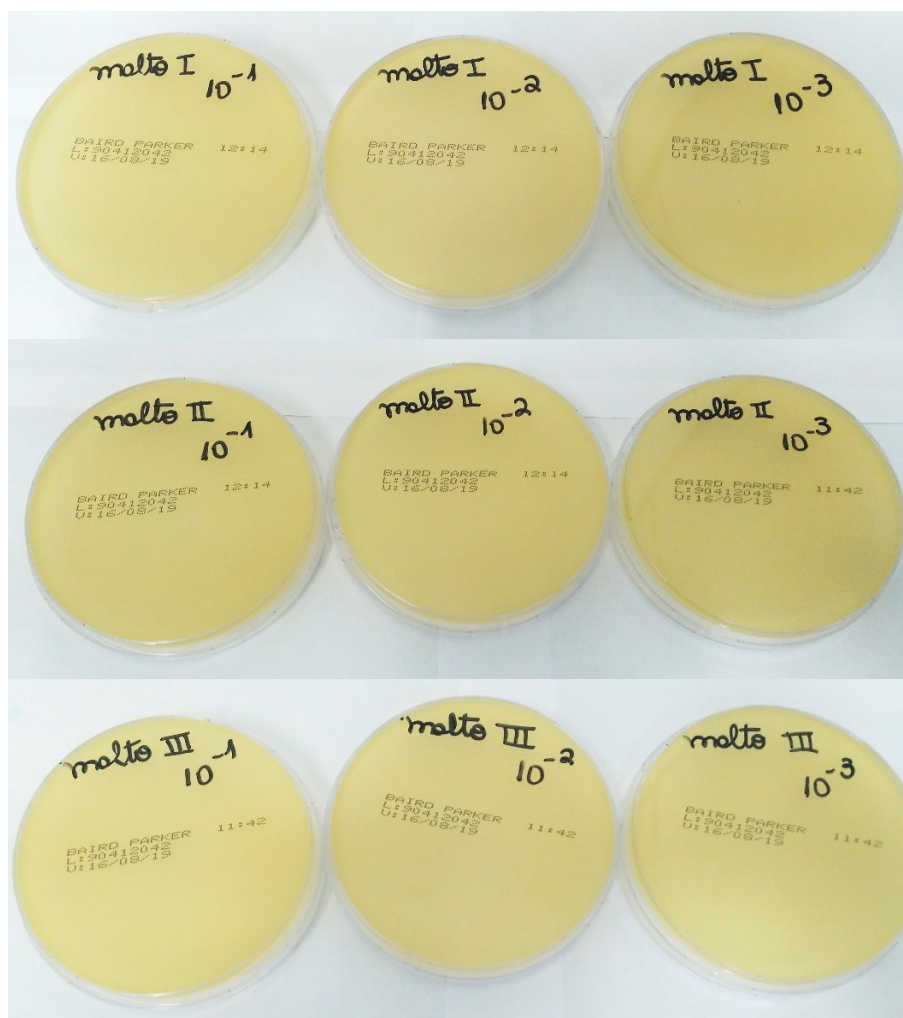
Fonte: da autora, 2019.

Nesse ensaio não foi observado o surgimento de unidade formadora de colônia. A legislação estabelece que a contagem de *B. Cereus* deve ser de 5×10^2 UFC/g para suplementos vitamínicos, desta forma, os resultados obtidos estão favoráveis aos limites exigidos.

3.3.4.4 Ensaio para investigação de *Estafilococos Coagulase Positiva*

Para a investigação de *Estafilococos coagulase positiva* na maltodextrina, foram feitos os ensaios apresentados na figura 17:

Figura 17 – Investigação de *Estafilococos coagulase positiva* na maltodextrina



Fonte: da autora, 2019.

Após a realização dos ensaios, não foi observado o surgimento de unidade formadora de colônia. A RDC nº12 de 2001, estabelece que a contagem de *Estafilococos*

coagulase positiva deve ser de 5×10^2 UFC/g para suplementos vitamínicos, baseando-se nos limites deste produto, esta amostra encontra-se dentro dos limites definidos na legislação.

4 CONCLUSÃO

Ao término da realização do estudo, foi possível verificar a importância dos princípios gerais de higiene alimentar, onde, através deles, é possível a fabricação de produtos que não causam nenhum risco para a saúde dos consumidores. As análises microbiológicas realizadas demandavam, a todo momento, de cuidados e extrema cautela com a limpeza, além do uso de EPIs adequados. A coleta e o transporte das matérias-primas também foram extremamente importantes, sendo consideradas etapas críticas, uma vez que, caso não fossem realizadas corretamente, poderiam interferir nos resultados finais.

Afim de confirmar se as matérias-primas utilizadas no processo produtivo pela empresa seriam ou não consideradas pontos críticos de controle, visando a implantação de um programa HACCP na empresa e possibilitando uma visão macro do processo no que diz a respeito da segurança alimentar, verificou-se se as matérias-primas seriam caracterizadas como agentes biológicos. Em muitas situações, não eram fornecidas informações sobre as características microbiológicas, sendo uma possível fonte de contaminação e risco para quem irá consumir o produto final.

Através das análises microbiológicas realizadas nas amostras de matérias-primas, foi possível constatar que, nos laudos onde haviam informações sobre as características microbiológicas, não havia nenhuma fonte de contaminação característica, não podendo ser considerado um agente biológico. Essa conclusão somente pode ser levada em consideração, se as condições de transporte, armazenamento e coleta forem realizadas da forma adequada.

Já nas análises das matérias-primas onde não há informações microbiológicas em seus laudos, houve incidência de crescimento de unidades formadoras de colônias, levantando a dúvida sobre a procedência do material e sobre as formas como este é processado e manipulado pelo fabricante/fornecedor, e sobretudo o risco que ele poderia trazer ao setor produtivo, caso a contaminação fosse significativa.

Nas investigações das bactérias *B. Cereus*, *Salmonella* e *Estafilococos Coagulase Positiva*, todas as amostras apresentaram-se dentro dos limites exigidos pela legislação, sendo que em alguns casos, nem houve surgimento de unidades formadoras de colônias.

Porém para as análises de *Coliformes totais* e *Escherichia Coli*, houveram crescimentos significativo de colônia na amostra de sulfato de magnésio, sendo esta matéria-prima, uma das quais não há informações sobre análises microbiológicas. Afim de que houvesse uma certeza quanto aos resultados obtidos, foram realizadas novas análises, onde não foi possível realizar a contagem de colônias nas placas, gerando a dúvida, se realmente essa

matéria-prima estava contaminada ou se os resultados obtidos anteriormente se deram por uma má manipulação das amostras, se foi contaminada em alguma das etapas de coleta, transporte ou armazenamento ou se os meios de cultura fornecidos já prontos para a empresa em questão, já vieram com contaminação do fabricante, levantando novas questões para uma futura investigação

A legislação para suplementos vitamínicos ainda é recente comparada a outros tipos de produtos, porém, ela existe e é de suma importância que as empresas as conheçam e as apliquem.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, Aline Guimarães. **Efeito da deficiência dietética de magnésio no metabolismo oxidativo de tecidos de ratos submetidos a protocolo de treinamento periodizado**. 2007. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: [file:///C:/Users/User/Desktop/TESE_Aline_G_Amorim%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/User/Desktop/TESE_Aline_G_Amorim%20(2).pdf). Acesso em: junho/2019.
- AFNOR. Association Française de Normalisation. ISO 16649-2:2001. Abril, 2001. Disponível em: <https://www.boutique.afnor.org/standard/iso-16649-22001/microbiology-of-food-and-animal-feeding-stuffs-horizontal-method-for-the-enumeration-of-beta-glucuronidase-positive-escherichia-/article/783173/xs012824>. Acesso em: junho/2019.
- BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Codex Alimentarius**. Site oficial. Brasília, DF: ANVISA, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/foruns-internacionais?inheritRedirect=true>. Acesso em: abril/2019.
- BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF: ANVISA, 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: abril/2019.
- CAMPBELL-PLATT, Geoffrey. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, 2015. 538 p. *E-book*. Disponível em: <https://bv4.digitalpages.com.br/?page=1§ion=0#/legacy/9788520434277>. Acesso em: abril/2019.
- DORNELAS, Camila B. *et al.* **Preparação e avaliação reacional de nanocompósitos de PVP K-30 - montmorilonita (natural e organicamente modificada) por difração de raios X**. Polímeros, São Carlos, v.18, n.2, p.187-192, Junho 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282008000200017&lng=en&nrm=iso. Acesso em: maio/2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282008000200017>.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. **Codex Alimentarius**. Site oficial. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/en/>. Acesso em: abril/2019.
- FORSYTHE, Stephen J. (Ed.). **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.
- FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.
- GIL, Antônio Carlos. Como elaborar projetos de pesquisa. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002.
- GIL, Eric de Souza; BRANDÃO, André Luiz Alves. **Excipientes: Suas aplicações e Controle Físico-Químico**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

JARDIM, Maira; SOUZA, Valéria Maria de; ANTUNES JUNIOR, Daniel. **A Farmacologia do Suplemento**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2017. 276 p.

LIGHTFOOT, N. F.; MAIER, E. A. **Análise Microbiológica de Alimentos e Água: Guia para Garantia da Qualidade**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 284 p.

MENDES, R. A.; COELHO, A. I. M.; AZEREDO, R. M. C. de. **Contaminação por *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição**. Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro, v. 16, n. 9, p. 3933-3938, Setembro 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011001000030&lng=en&nrm=iso. Acesso em: abril/2019.

NISBET, J. e WATT, J. **Case Study**. Readguide 26: Guides in Educational Research. University of Nottingham School of Education, 1978.

ROCHA, Ádamo O. B. *et al.* **Diagnóstico da Utilização do Sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) em uma Indústria de Leite e Derivados**. Brazilian Journal Of Production Engineering, São Mateus, v. 2, n. 4, p.135-159, 15 ago. 2018. Disponível em: http://periodicos.ufes.br/BJPE/article/view/v4n2_9/pdf. Acesso em: maio/2019.

SILVA, J. A. A. da; COSTA, E. A.; LUCCHESI, G. **SUS 30 anos: Vigilância Sanitária**. Ciênc. Saúde coletiva, Rio de Janeiro, v.23, n.6, p.1953-1961, junho 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232018000601953&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: maio/2019.

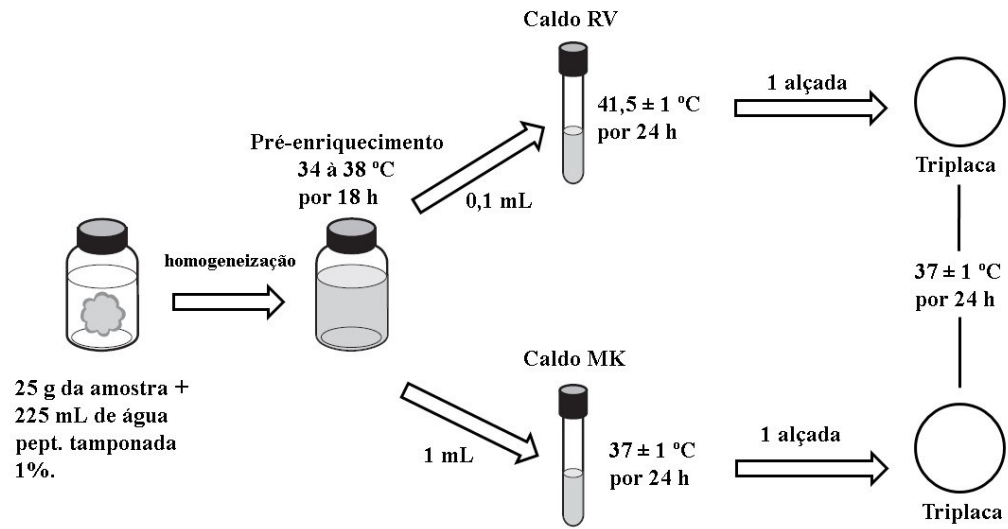
SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 624 p.

_____. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 560 p. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=ki9dDwAAQBAJ&lpg=PA153&dq=ISO%206888%20completa&hl=pt-BR&pg=PA153#v=onepage&q=6888&f=false>. Acesso em: junho/2019.

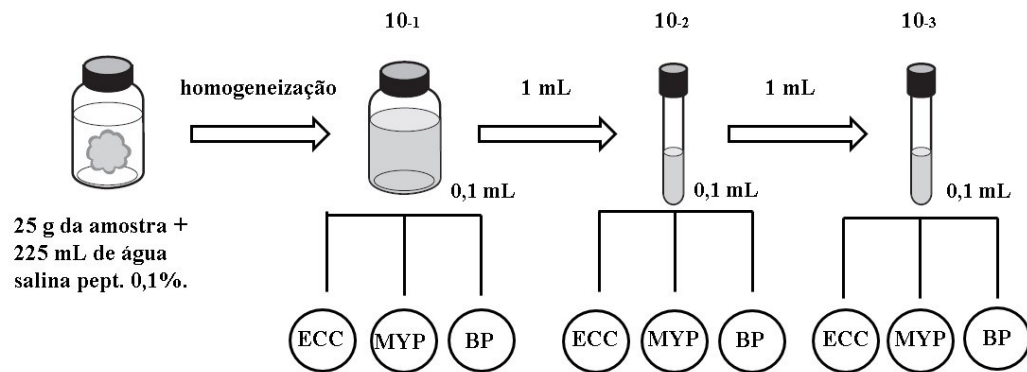
VENTURA, Magda Maria. **O estudo de caso como modalidade de pesquisa**. Rev SOCERJ. Vol. 20, nº. 5, p.383-386, setembro/outubro 2007. Disponível em: http://unisc.br/portal/upload/com_arquivo/o_estudo_de_caso_como_modalidade_de_pesquisa.pdf. Acesso em: maio/2019.

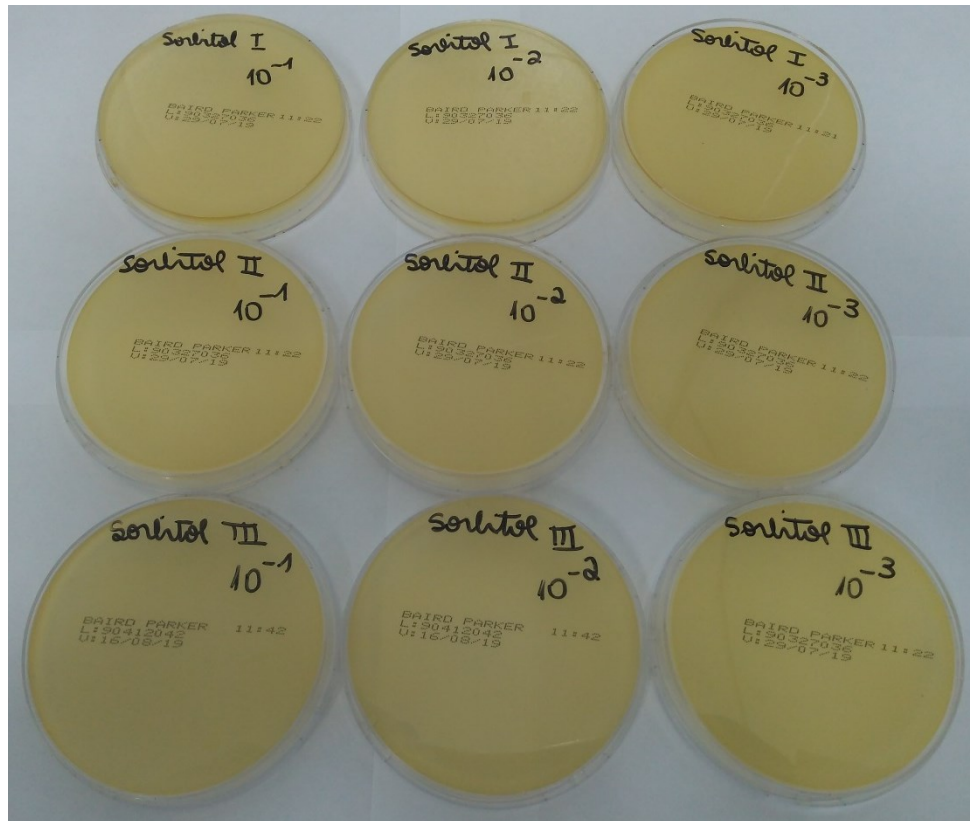
YIN, Robert K. **Estudo de caso: planejamento e métodos**. Tradução: Daniel Grassi. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.

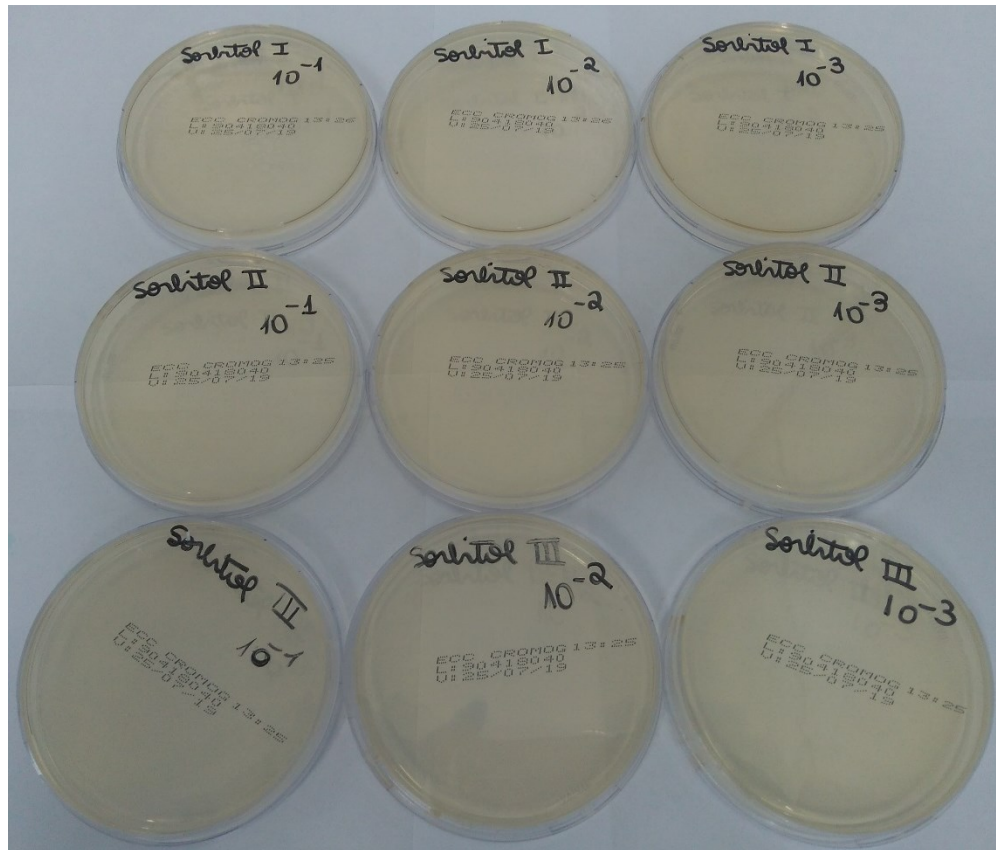
APÊNDICE

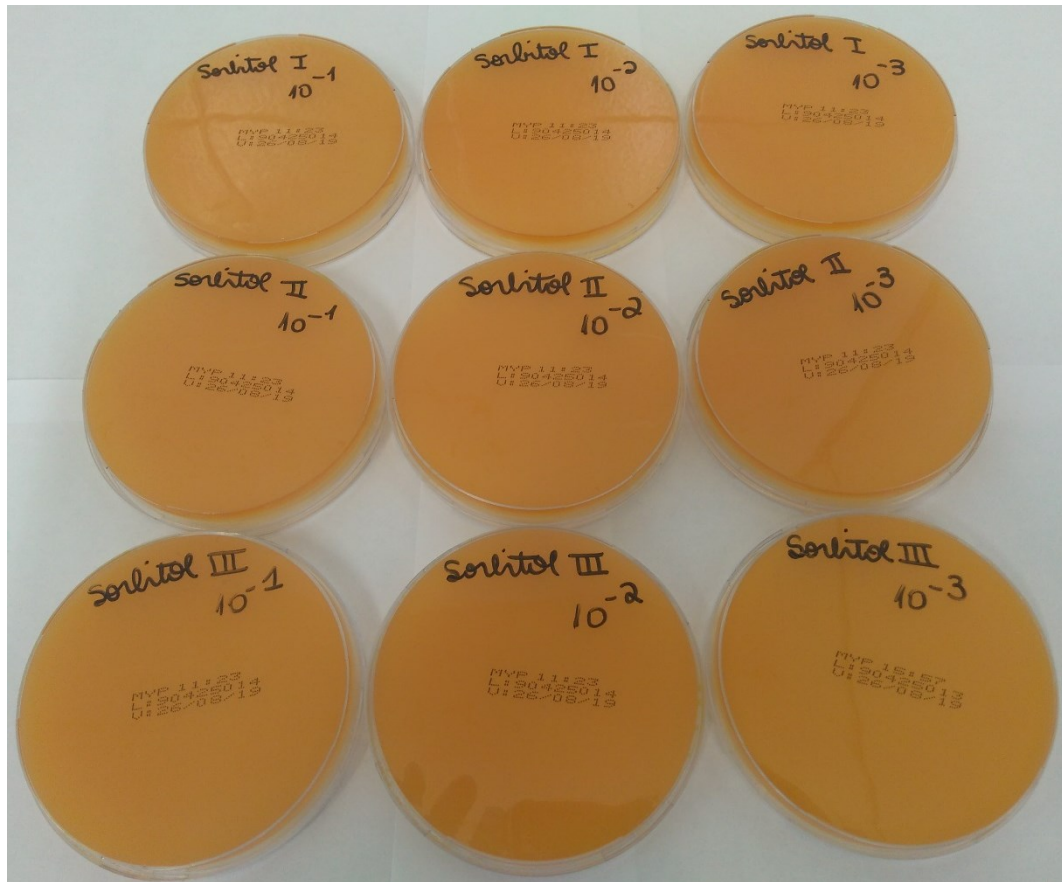
APÊNDICE A – Esquema dos ensaios para investigação de *Salmonella*

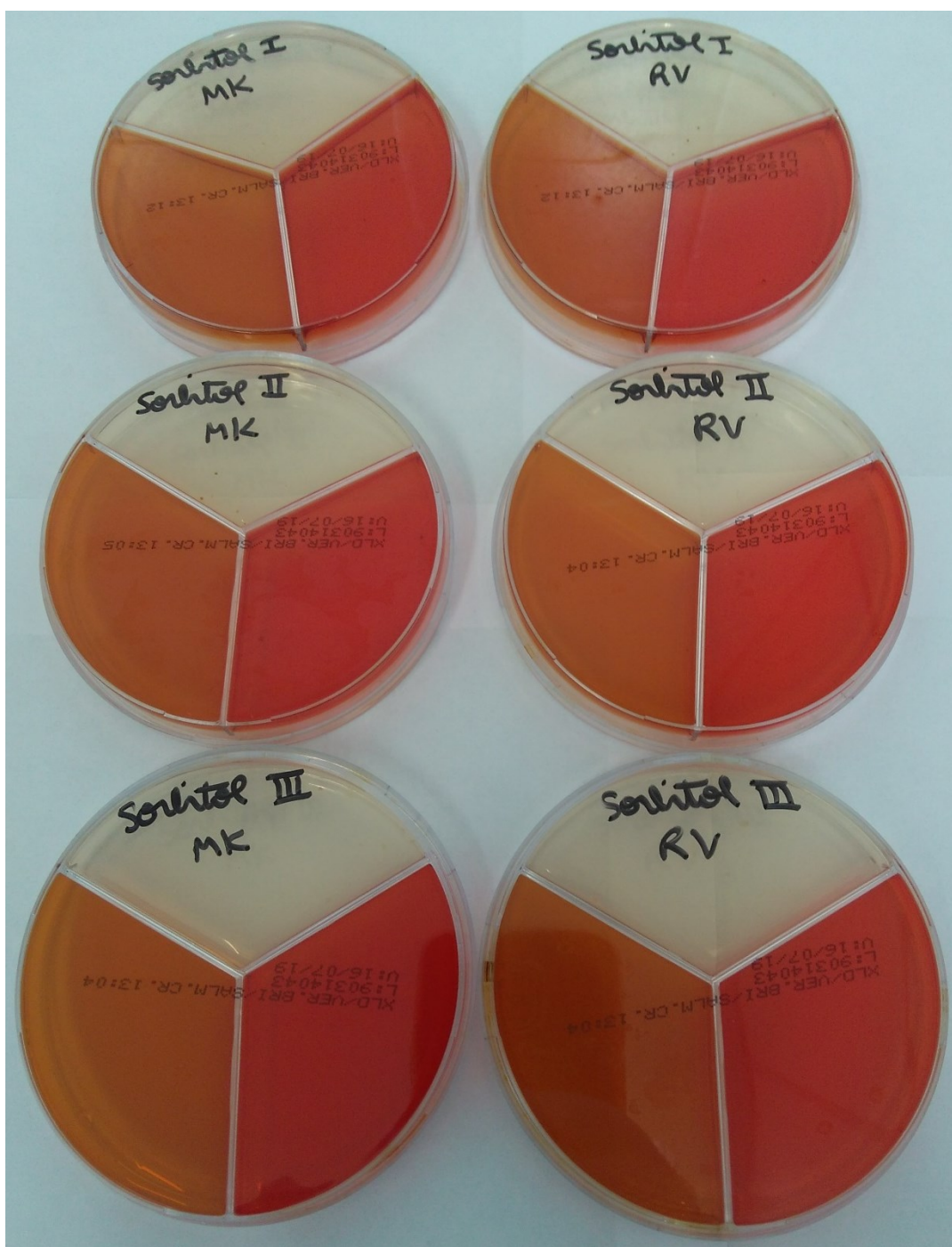
APÊNDICE B – Esquema dos ensaios para *B. Cereus*, *Estafilococos coagulase positiva* e *Coliformes* e *E. Coli*

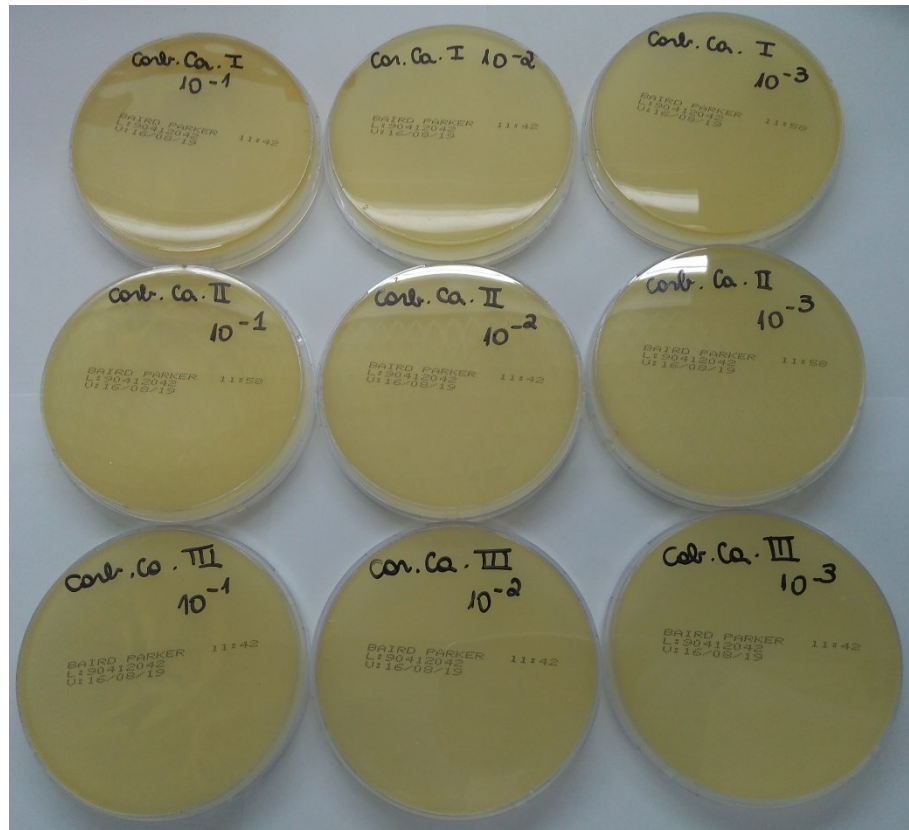


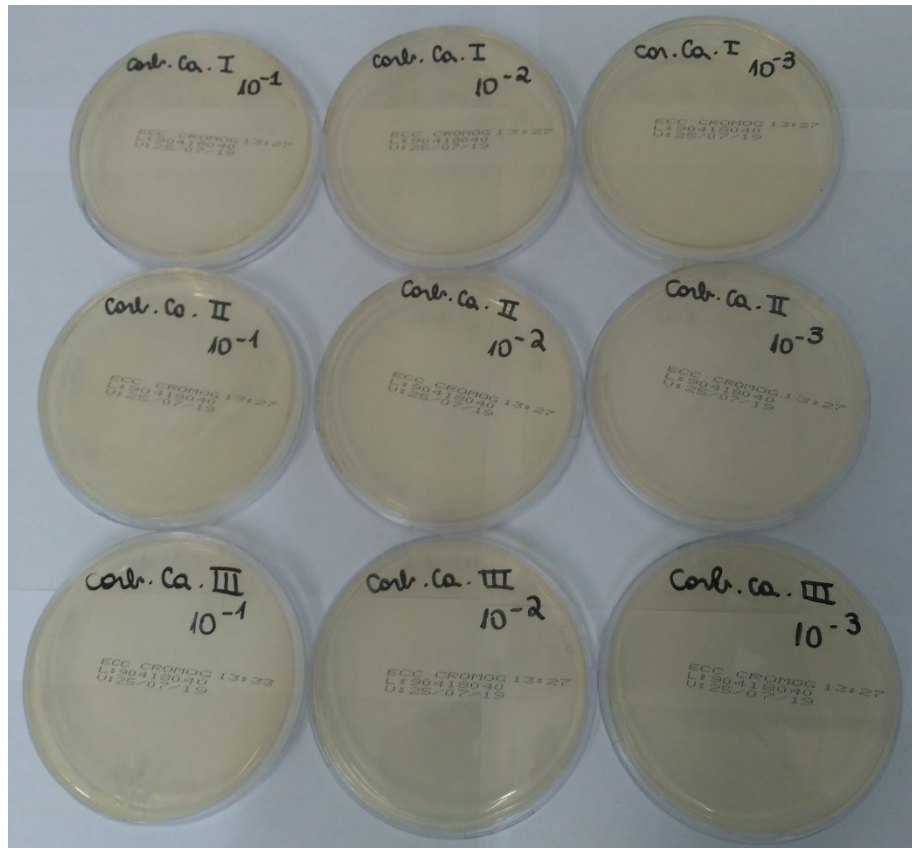
APÊNDICE C – Ensaio para Estafilococos Coagulase Positiva no Sorbitol

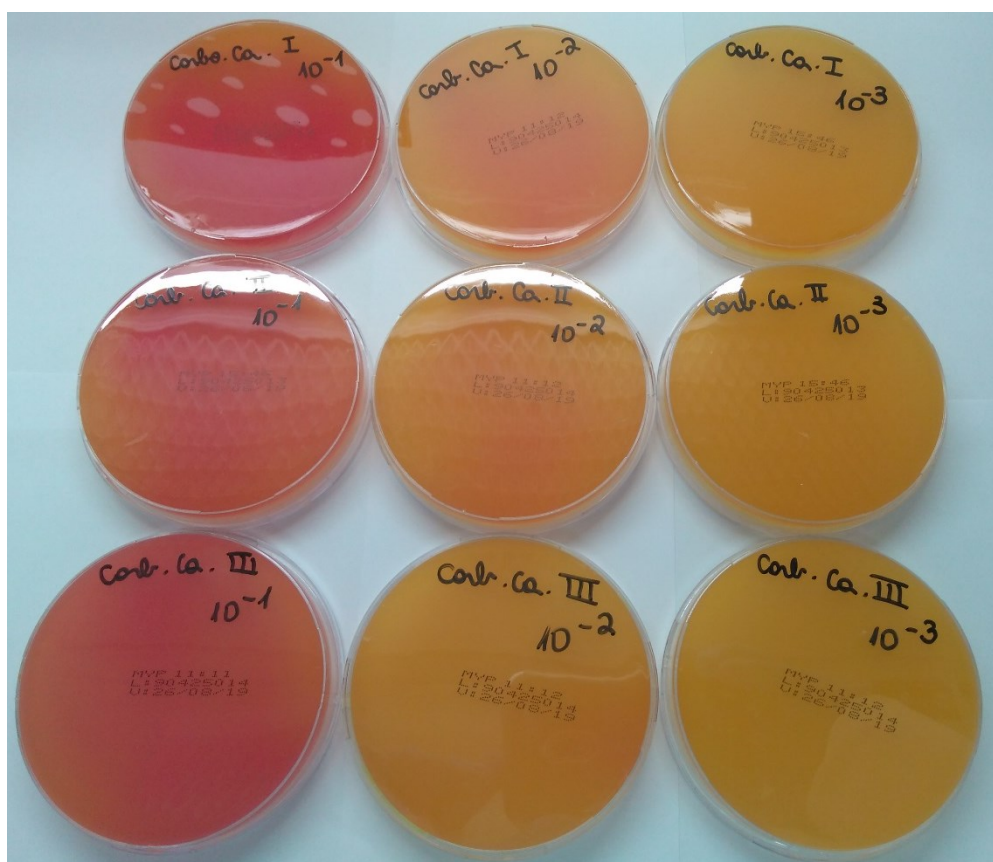
APÊNDICE D – Ensaio para *Coliformes* e *Escherichia Coli* no sorbitol

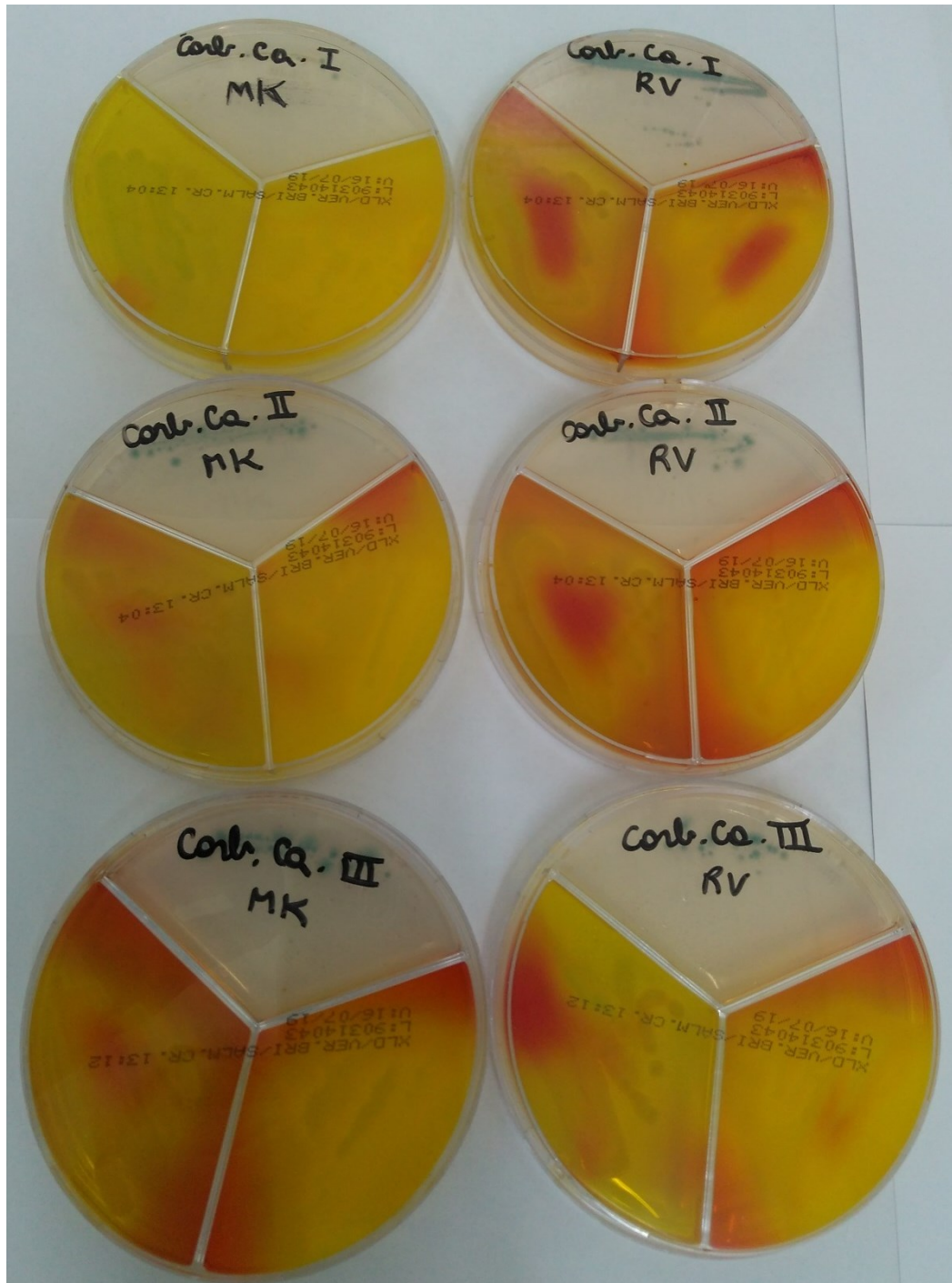
APÊNDICE E – Ensaio para *B. Cereus* no sorbitol

APÊNDICE F – Ensaio para investigação de *Salmonella* no sorbitol

APÊNDICE G – Ensaio para *Estafilococos coagulase positiva* no carbonato de cálcio

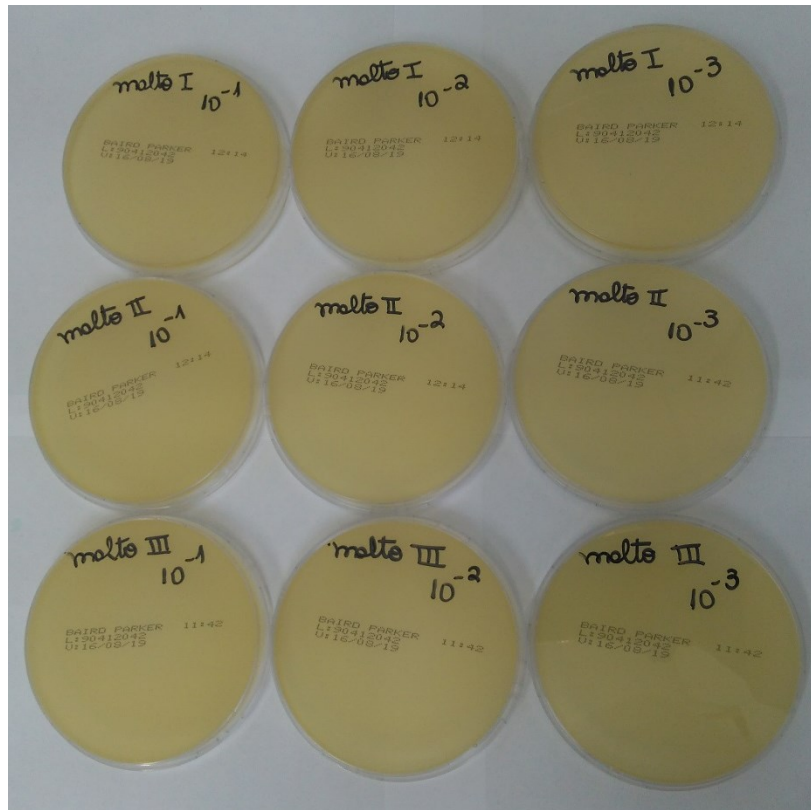
APÊNDICE H – Ensaio para *Coliformes* e *E. Coli* no carbonato de cálcio

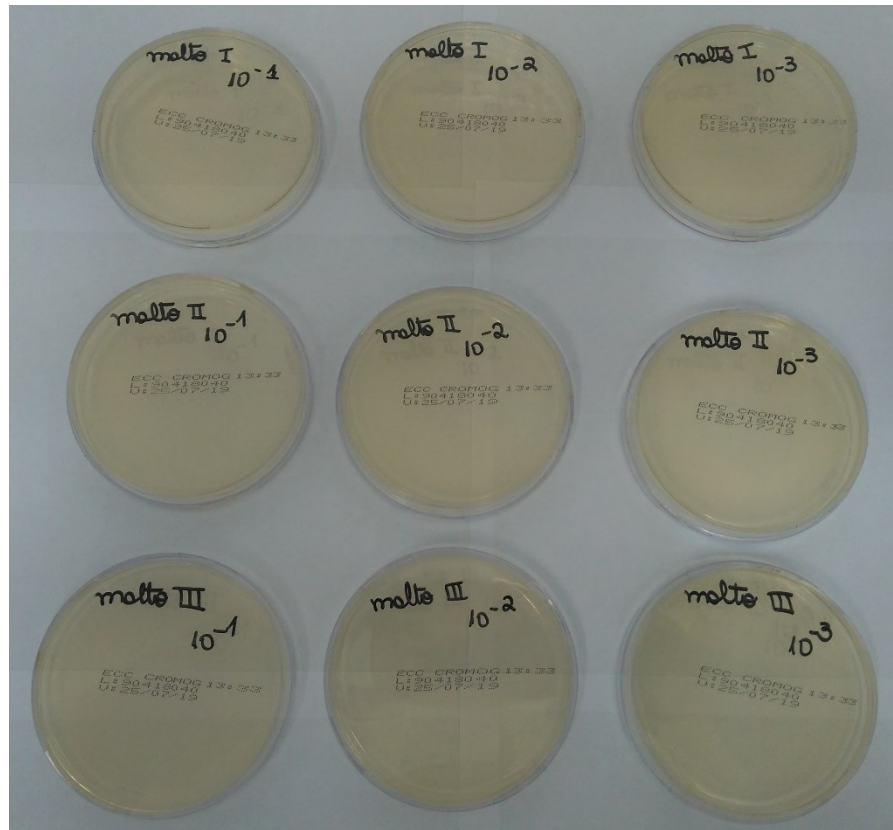
APÊNDICE I – Ensaio para *B. Cereus* no carbonato de cálcio

APÊNDICE J – Ensaio para *Salmonella* no carbonato de cálcio

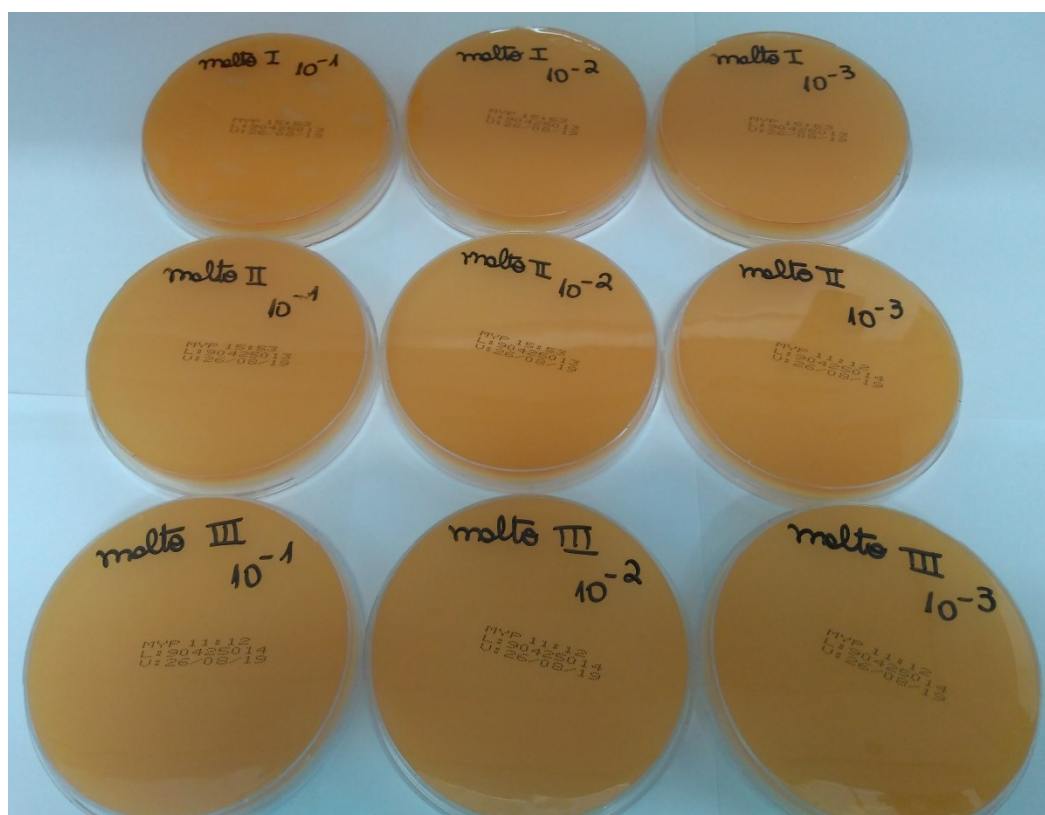
APÊNDICE K – Triplaca para *Salmonella* com colônias atípicas

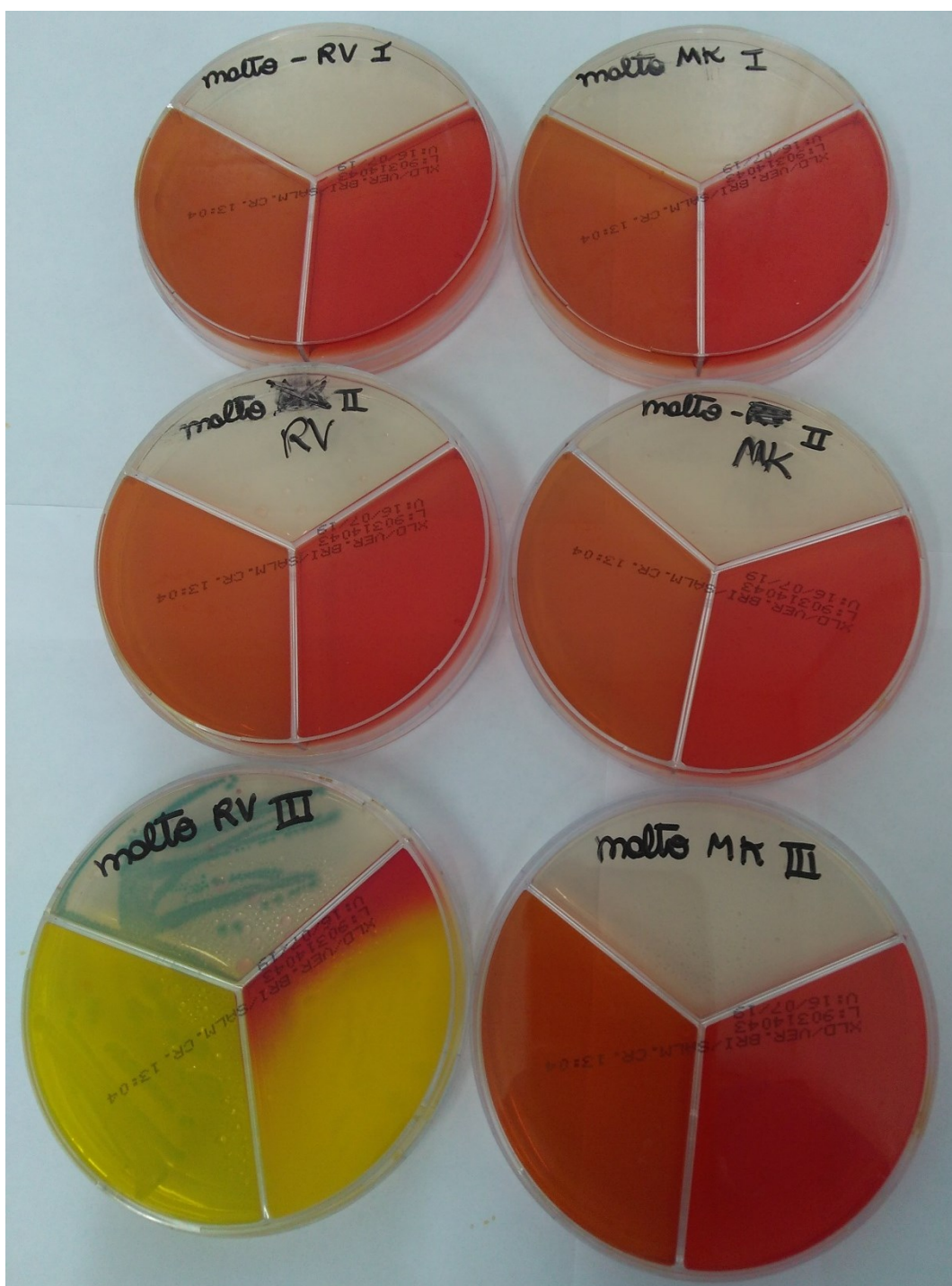


APÊNDICE L – Ensaio para *Estafilococos coagulase positiva* na maltodextrina

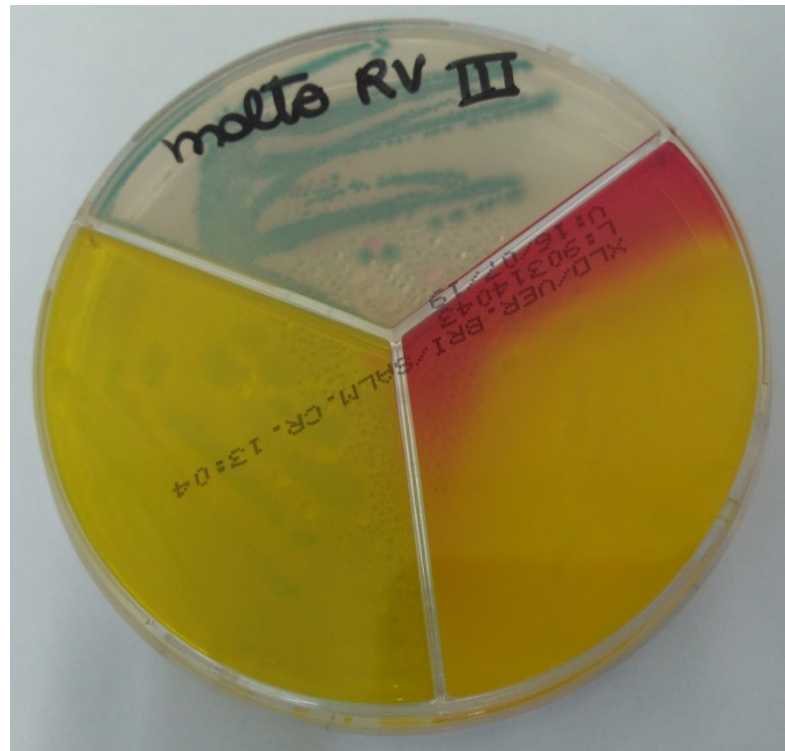
APÊNDICE M – Ensaio para *Coliformes* e *E. Coli* na maltodextrina

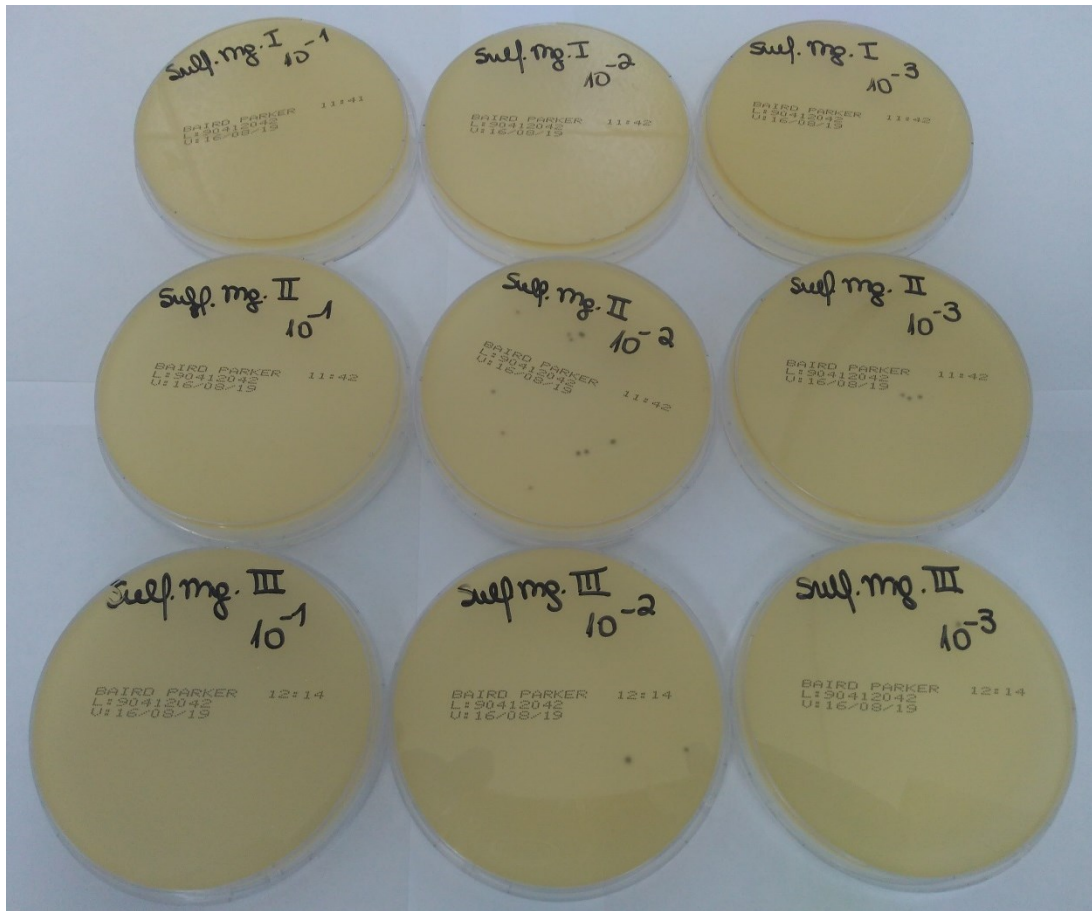
APÊNDICE N – Ensaio para *B. Cereus* na maltodextrina



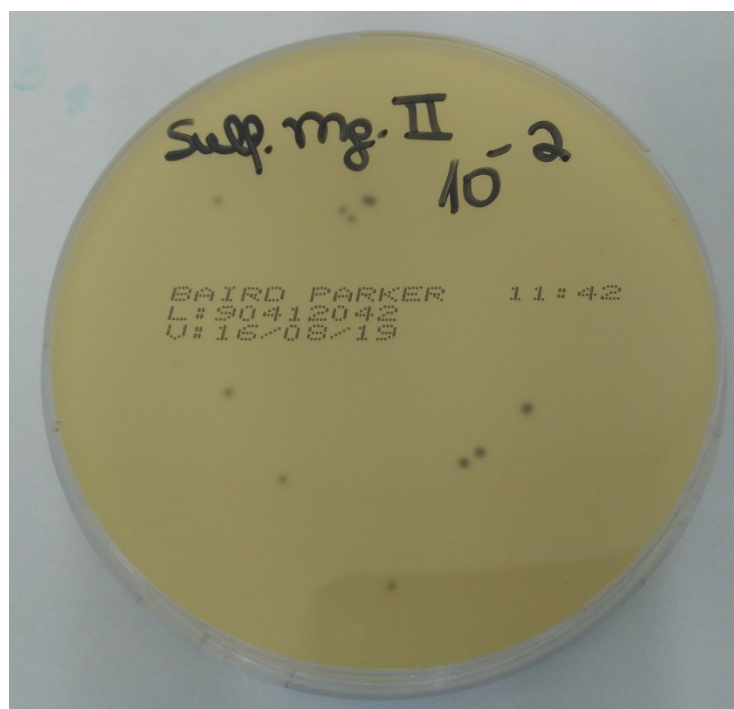
APÊNDICE O – Ensaio para *Salmonella* na maltodextrina

APÊNDICE P – Crescimento de colônias atípicas em triplaca para *Salmonella*

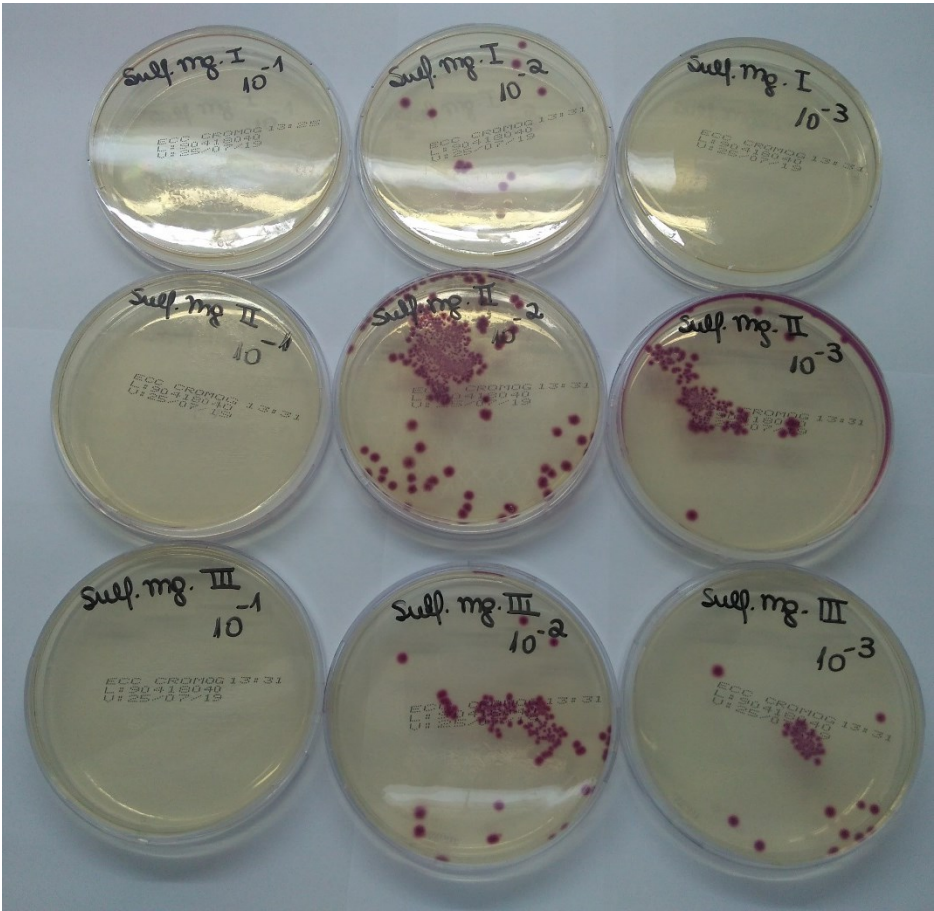


APÊNDICE Q – Ensaio para *Estafilococos coagulase positiva* no sulfato de magnésio

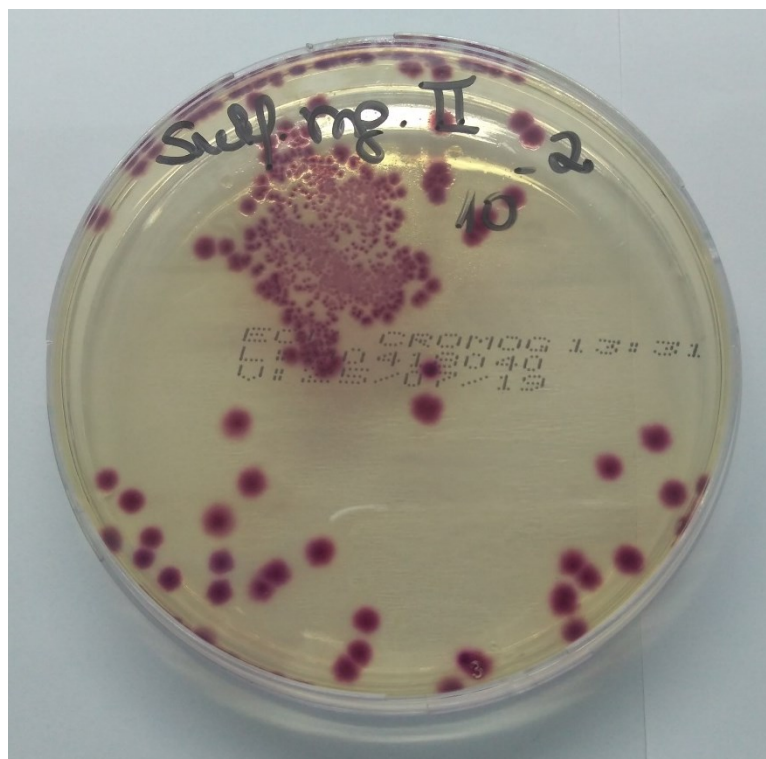
APÊNDICE R – Crescimento de colônias atípicas em ágar *Baird Parker* para *Estafilococos coagulase positiva*



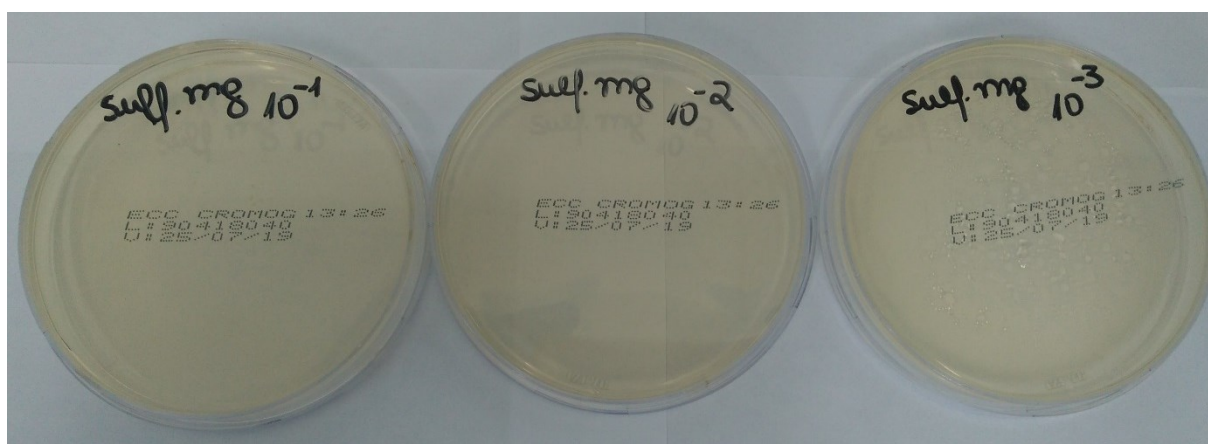
APÊNDICE S – Ensaio para *Coliformes* e *E. Coli* no sulfato de magnésio

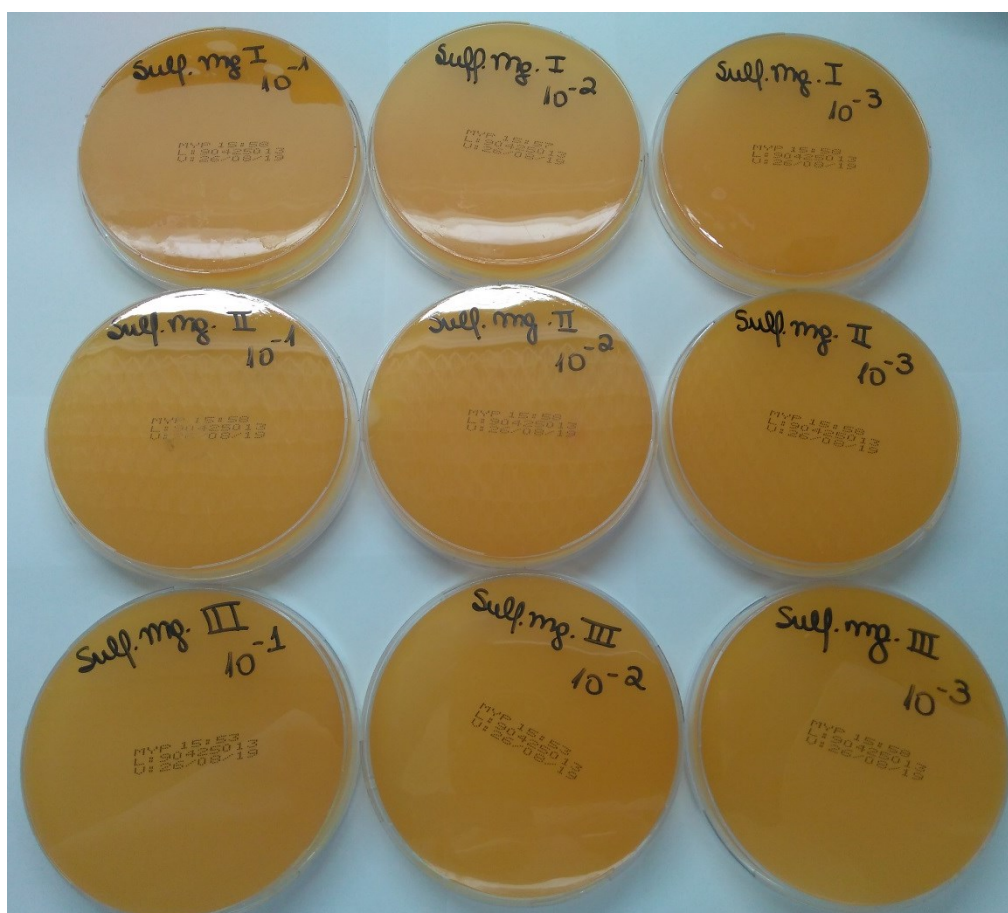


APÊNDICE T – Crescimento de colônias atípicas em ágar Baird ECC para *Coliformes* e *E. Coli*



APÊNDICE U – Renálise para *Coliformes* e *E. Coli* no sulfato de magnésio



APÊNDICE V – Ensaio para *B. Cereus* no sulfato de magnésio

APÊNDICE X – Ensaio para *Salmonella* no sulfato de magnésio

