

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Maria Luiza Cabral da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE ITENS DE ENSAIO EM MATRIZ CHOCOLATE  
DESTINADO A ENSAIO DE PROFICIÊNCIA EM MICROBIOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

Rio de Janeiro

2016

Maria Luiza Cabral da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE ITENS DE ENSAIO EM MATRIZ CHOCOLATE  
DESTINADO A ENSAIO DE PROFICIÊNCIA EM MICROBIOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Paola Cardarelli-Leite

Silvia Maria dos Reis Lopes

Rio de Janeiro

2016

☐

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Silva, Maria Luiza Cabral da

Desenvolvimento de itens de ensaio em matriz chocolate destinado a ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos / Maria Luiza Cabral da Silva – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

82 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Orientadoras: Paola Cardarelli-Leite e Silvia Maria dos Reis Lopes

1. Ensaio de Proficiência Laboratorial. 2. Contaminação de Alimentos. 3. Cacau. 4. Salmonella 5. Coagulase. 6. Escherichia coli. I. Título

Development of test items in chocolate matrix for proficiency testing in food microbiology

Maria Luiza Cabral da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE ITENS DE ENSAIO EM MATRIZ CHOCOLATE  
DESTINADO A ENSAIO DE PROFICIÊNCIA EM MICROBIOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: 17/02/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Celio Mauro Viana (Doutor)  
Universidade Federal Fluminense

---

Janaína Marques Rodrigues Caixeiro (Doutor)  
Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia

---

Paola Cardarelli-Leite (Doutor) Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Silvia Maria dos Reis Lopes (Doutor) Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a minha mãe  
Ana Paula.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde necessária para concretizar este sonho e por estar sempre ao meu lado nas angústias, aflições e na alegria. Seu fôlego de vida em mim foi meu sustento, nos momentos que pensei em desistir, seu amor me deu coragem para prosseguir. Obrigada meu Deus por esta vitória!

Com imenso amor e carinho à minha rainha, que é meu exemplo de ser humano, sempre com muita força, fé e determinação. Mãe, a senhora é essencial na minha vida. Obrigada por enxugar minhas lágrimas, obrigada por acreditar em mim, obrigada pelo seu esforço, que, diante as circunstâncias, sempre sorria para não me preocupar, obrigada pelas comemorações frente a cada vitória e acima de tudo, pelo amor eterno. Te amo.

À minha vizinha Maria Teresa que infelizmente não está mais aqui comigo, mas tenho certeza que continua cuidando de mim. Essa conquista também é sua, obrigada pelos ensinamentos, carinho, amor, e dedicação total, palavras são poucas para demonstrar o meu amor pela senhora. Te amo.

Ao meu amado irmão, Rafael, pela amizade, amor, cumplicidade e por estar sempre me ajudando em todos os momentos. Te amo.

Ao Raphael, pela paciência nos meus momentos de desespero, pela espera nos momentos da minha ausência, pelo apoio, incentivo.

À minha orientadora Dra. Paola Cardarelli, pelos conselhos, infinitos ensinamentos, dedicação, e sempre disposta a me ajudar e a me ouvir nos momentos mais complicados. Obrigada pelo carinho, paciência e a sincera amizade. Palavras são poucas para demonstrar todo meu carinho por você.

À minha Co-orientadora Dra. Silvia Maria dos Reis Lopes, pelos ensinamentos e colaboração para que este trabalho fosse realizado.

À minha querida prima Águeda, por sempre estar disposta a me ajudar, encorajar e incentivar, pelos conselhos, pela torcida e por me fazer acreditar sempre que daria tudo certo. Muito obrigada.

Aos meus adoráveis amigos Marcelo Brandão e Rodrigo Tavares, por cada explicação, pela atenção, pelos constantes ensinamentos e pela boa vontade em todas as vezes que os recorri para sanar minhas dúvidas. Palavras são poucas para demonstrar a minha imensa gratidão por vocês. Muito obrigada.

Às queridas Cátia Cardoso e Valéria Medeiros, pelo carinho, pela paciência, pelo convívio, pelos ensinamentos, amizade, pelo cuidado comigo, e sempre mostrando disposição e dedicação e compreensão. Adoro vocês.

Aos colegas Max, Karine, Carla Rosas, Carla Trece, Débora e Natália do Setor de Alimentos, pela ajuda, pelas risadas, que tornaram o ambiente de trabalho tão especial.

Ao Dr. Marcus Henrique de la Cruz pela colaboração nas análises estatísticas, pela infinita paciência, colaboração e ensinamentos. Muito obrigada.

À querida Renata Trotta do laboratório de Biologia Molecular, pela infinita paciência, pelas palavras doces nos momentos de desespero, pela amizade e por sempre me incentivar e acreditar em mim.

Ao meu amado Pastor Mário, por todo carinho, amizade, inúmeros conselhos e infinitas orações para que este sonho fosse realizado.

Aos companheiros dos Setores de Meio de Cultura e Esterilização pela atenção e eficiência ao atendimento dos pedidos para elaboração deste trabalho.

As colegas de turma, pelos belos momentos compartilhados e a todos os professores.

A coordenação da Pós-Graduação pela oportunidade e ajuda financeira. Aos demais membros docentes, a todo time da secretaria pela paciência e colaboração.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz pela oportunidade.

E a todos que contribuíram para execução deste trabalho, não canso de agradecer.

Por que Dele por Ele e para Ele, são todas as coisas, Glória, pois, a Ele eternamente. Amém!

(Rm 11:36)

## RESUMO

O chocolate é um alimento muito popular por suas propriedades sensoriais, e possui alto valor nutritivo e energético. Devido aos surtos de salmonelose relacionados ao consumo desse alimento, o seu controle microbiológico é de grande importância. No Brasil, a RDC nº12/2001 estabelece os seguintes parâmetros para a avaliação da qualidade microbiológica de chocolate: limite de 10 UFC/g para coliformes a 45°C, limite de 10<sup>3</sup> UFC/g para estafilococos coagulase positiva (ECP) e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g. Para gerenciar a qualidade em laboratórios de ensaios, a principal norma adotada é a ISO/IEC 17025:2005, que traz entre os requisitos, o uso de itens de ensaio (IE) para o controle laboratorial interno e a participação periódica em programas de ensaio de proficiência (EP) e/ou comparações interlaboratoriais. O objetivo desse estudo foi desenvolver IE, por meio do método de liofilização, para os micro-organismos descritos na legislação em matriz chocolate, para utilização em EP. Foi realizada a análise microbiológica das amostras de chocolate em barra, em pó e granulado para verificar se a amostra estava livre dos micro-organismos alvo. Foram produzidos seis lotes piloto para cada micro-organismo com e sem pré-liofilização para escolher a melhor matriz. Para monitoramento da qualidade dos IE, verificou-se vácuo, homogeneidade e estabilidade em longo e curto prazo. A análise microbiológica das amostras indicou ausência de contaminação pelos micro-organismos alvo na matriz. O processo de pré-liofilização nos lotes piloto não resultou em diferenças significativas no número de UFC/g, sendo escolhido para matriz o chocolate granulado sem pré-liofilização. Foram produzidos quatro lotes utilizando os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Citrobacter freundii*. A técnica de liofilização, com uso de sacarose e trealose como crioprotetores, se mostrou eficaz para dessecação dos IE produzidos. Os lotes de *S. aureus* e *E. coli* apresentaram resultados suficientemente homogêneos, o que não ocorreu no lote de *Salmonella* spp. Todos os IE se apresentaram estáveis à temperatura de -20 °C (em 5 semanas) e -70 °C (em 26 semanas); na estabilidade de transporte, os lotes de *Salmonella* spp e *Citrobacter freundii* foram considerados estáveis a 4 °C e 35 °C (em 4 dias) e os de *S. aureus* e *E. coli* foram considerados estáveis apenas a 4 °C. A produção desses IE em matriz chocolate para detecção desses micro-organismos possibilitará a realização de EP visando contribuir para o aumento da confiabilidade dos resultados das análises dos laboratórios e propiciar subsídios para a identificação e solução de problemas.

**Palavras-chave:** Item de ensaio. Ensaio de Proficiência. Chocolate. *Salmonella* spp. Estafilococos coagulase positiva. *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

Chocolate is a very popular food known for its sensory attributes and possesses both high nutritional and energy value. Due to a number of salmonellosis outbreaks related to its consumption, microbiological control is very important. Brazil has enacted a regulation (RDC n° 12/2001) that establishes the following threshold parameters to assess the microbiological quality of chocolate: 10 CFU/g maximum level of coliforms at 45°C, limit of 10<sup>3</sup> CFU/g for coagulase-positive staphylococci, and absence of *Salmonella* spp. In order to ensure the quality management, the main norm adopted is the ISO/IEC 17025:2005, which determines as a requirement the use of test items (TI) for the internal laboratory control and regular participation in proficiency testing programs (PTP) and/or interlaboratory comparisons. The aim of this study was to develop test items through the lyophilization technique, for the microorganisms described in Brazilian legislation, in chocolate matrix for use in PTP. Microbial analysis was conducted on samples of bar, granulated and powdered chocolate to verify that the sample was free of target microorganisms. Six pilot scale batches were produced for each microorganism with and without pre-lyophilization to select the best matrix. For monitoring the quality of TI, was checked vacuum, homogeneity and stability in long and short term. The results of the microbial testing indicated no contamination in the matrix. The pre-lyophilization process showed no significant difference in the number of CFU/g being chosen for the matrix granulate chocolate without pre-lyophilization. Four batches were produced using the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Citrobacter freundii*. The lyophilization technique, using saccharose and trehalose as cryoprotectants, has proven effective for desiccation of TI produced. Batches of *S. aureus* and *E. coli* had sufficiently homogeneous results, which did not occur in the batch of *Salmonella* spp. All TI were held stable at -20°C (5 weeks) and -70°C (26 weeks). *Salmonella* spp. and *Citrobacter freundii* were considered stable at 4°C and 35°C (in 4 days), and *S. aureus* and *E. coli* stable only at 4°C. The production of TI in chocolate matrix to detect these microorganisms will allow the execution of PTP to contribute to increase reliability of the test results from laboratories, and provide subsidies for identification and troubleshooting.

**Keywords:** Sample; Proficiency testing programs. Chocolate. *Salmonella* spp. coagulase-positive *Staphylococci*. *Escherichia coli*.

## LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC – Ágar Plate Count

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – Brain Heart Infusion

BP – Ágar Baird Parker

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CLIA – Clinical Laboratory Improvement Amendments

CONASEMS – Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde

CONASS – Conselho Nacional de Secretários Nacionais de Saúde

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

*E. coli* – *Escherichia coli*

ECP – Estafilococos Coagulase Positiva

EP – Ensaio de Proficiência

EUA – Estados Unidos da América

FEPAS – *Food Examination Performance Assessment Scheme*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HK – Ágar Entérico Hektoen

IE – Item de Ensaio

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISO – *International Organization for Standardization*

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LST – Caldo Lauril Sulfato Triptose

MS – Ministério da Saúde

NMP –Número mais Provável

RV – Rappaport-Vassiliadis

SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

SSP – Solução Salina Peptonada

SUS – Sistema Único de Saúde

TB – Tampão Fosfatado de Butterfield

TT – Caldo Tetracionato

UFC /g – Unidade Formadora de Colônia por Grama

VISA –Vigilância Sanitária Estaduais, do Distrito Federal e Municipais

VRBA – Ágar Vermelho Neutro Cristal Violeta Bile Lactose

VRBG - Ágar Vermelho Neutro Cristal Violeta Bile Glicose

XLD – Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1: Provedores de Ensaio de Proficiência em microbiologia de alimentos pelo mundo .....  | 19 |
| Quadro 2: Informações nutricionais dos candidatos a matriz chocolate para item de ensaio.....  | 36 |
| Quadro 3: Comparação dos lotes pilotos obtidos dos candidatos à matriz chocolate para produção de item de ensaio .....   | 53 |
| Figura 1: Variação da concentração de células do lote de item de ensaio de <i>Salmonella</i> spp estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C.....    | 61 |
| Figura 2: Variação da concentração de células do lote de item de ensaio de <i>S. aureus</i> estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C .....        | 62 |
| Figura 3: Variação da concentração de células do lote de item de ensaio de <i>Escherichia coli</i> estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C ..... | 63 |
| Figura 4: Variação da concentração de células do lote de item de ensaio de <i>Citrobacter freundii</i> estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C   | 64 |
| Figura 6: Variação da concentração de células dos IE estocados a temperatura de -70°C durante 26 semanas.....  | 67 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Valores de F1 e F2 para o ensaio de homogeneidade de acordo com o número de unidades analisadas.....  | 50 |
| Tabela 2: Concentração das suspensões dos micro-organismos na produção dos diferentes lotes de itens de ensaio.....   | 55 |
| Tabela 3: Contagem das UFC do teste de homogeneidade do lote de item de ensaio de <i>Salmonella</i> spp.....  | 56 |
| Tabela 4: Contagem das UFC do teste de homogeneidade do lote de item de ensaio de <i>S. aureus</i> .....  | 57 |
| Tabela 5: Contagem das UFC do teste de homogeneidade do lote de item de ensaio de <i>Escherichia coli</i> .....   | 58 |
| Tabela 6: Contagem das UFC do teste de homogeneidade do lote de item de ensaio de <i>Citrobacter freudii</i> .....  | 59 |
| Tabela 7: Contagem das UFC do estudo de estabilidade em curto prazo (transporte) do lote de item de ensaio de <i>Salmonella</i> spp. estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C..... | 60 |
| Tabela 8: Contagem das UFC do estudo de estabilidade em curto prazo (transporte) do lote de item de ensaio <i>S. aureus</i> estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C.....          | 61 |
| Tabela 11: Resultado das contagens do estudo de estabilidade em longa duração durante cinco semanas estocados a -20°C.....  | 65 |
| Tabela 12: Contagem das UFC do estudo de estabilidade em longa duração durante 26 semanas estocados a -70°C.....  | 66 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 15 |
| 1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA .....   | 15 |
| 1.2 SISTEMA DA QUALIDADE .....   | 16 |
| 1.3 ENSAIO DE PROFICIÊNCIA .....   | 17 |
| 1.4 ITEM DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA.....  | 19 |
| 1.4.1 Crioprotetores.....  | 20 |
| 1.4.2 Trealose endógena .....  | 21 |
| 1.5 TESTE DA HOMOGENEIDADE.....  | 21 |
| 1.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE.....  | 22 |
| 1.7 CACAU.....   | 23 |
| 1.8 CHOCOLATE .....  | 25 |
| 1.9 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA CHOCOLATE.....  | 27 |
| 1.9.1 Coliformes .....   | 27 |
| 1.9.2 Estafilococos Coagulase Positiva.....  | 28 |
| 1.9.3 <i>Salmonella</i> .....  | 29 |
| 1.9.4 <i>Citrobacter freundii</i> .....  | 30 |
| 1.10 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....   | 31 |
| 1.11 JUSTIFICATIVA .....   | 33 |
| 2 OBJETIVOS .....  | 34 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....   | 34 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 34 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 35 |
| 3.1 LOCAL DE ESTUDO.....   | 35 |
| 3.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE CHOCOLATES.....                                 | 35 |
| 3.2.1 Análise Microbiológica para Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....                   | 36 |
| 3.2.2 Análise Microbiológica para Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) ..... | 38 |
| 3.2.3 Análise Microbiológica para Enumeração de Coliformes a 45°C.....                     | 39 |
| 3.3 ESCOLHA DA MATRIZ.....   | 39 |
| 3.4 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA E PRODUÇÃO DOS ITENS DE ENSAIO.....                    | 40 |
| 3.4.1 Verificação da Pureza .....  | 40 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4.2 <i>Salmonella</i> spp.....                                    | 40 |
| 3.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....                            | 42 |
| 3.4.4 <i>Escherichia coli</i> .....                                 | 43 |
| 3.4.5 <i>Citrobacter freundii</i> .....                             | 45 |
| 3.4.6 Inspeção Visual .....   | 46 |
| 3.4.7 Verificação do Vácuo.....                                     | 46 |
| 3.5 TESTE DA HOMOGENEIDADE DO LOTE FINAL.....                       | 47 |
| 3.5.1 Avaliação Estatística da Homogeneidade .....                  | 48 |
| 3.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO LOTE FINAL .....                      | 50 |
| 3.6.1 Estudo da Estabilidade em Curta Duração.....                  | 50 |
| 3.6.2 Estudo da Estabilidade em Longa Duração .....                 | 51 |
| 3.6.3 Avaliação Estatística do Estudo da Estabilidade.....          | 51 |
| 4 RESULTADOS .....  | 52 |
| 4.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS .....                       | 52 |
| 4.2 ESCOLHA DA MATRIZ.....  | 52 |
| 4.2.1 Inspeção visual.....  | 54 |
| 4.3 PRODUÇÃO DOS ITENS DE ENSAIO .....                              | 54 |
| 4.3.1 Verificação da pureza.....                                    | 54 |
| 4.3.2 Análise da Concentração Celular Durante o Preparo dos IE..... | 55 |
| 4.3.3 Verificação do vácuo .....                                    | 55 |
| 4.4 TESTE DA HOMOGENEIDADE.....                                     | 55 |
| 4.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE.....                                     | 60 |
| 5 DISCUSSÃO .....   | 68 |
| 6 CONCLUSÕES .....  | 73 |
| REFERÊNCIAS.....  | 74 |

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o artigo segundo da Lei nº 8.080 de 19/9/1990, “*a saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício*”. O artigo sexto diz que “*estão incluídas no campo de atuação do Sistema Único de Saúde, a execução de ações de vigilância sanitária; controle e fiscalização de alimentos, água e bebidas para o consumo humano*” (BRASIL, 1990).

### 1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A Vigilância Sanitária tem origem na ‘política sanitária’, que, desde o século XVII, tem o objetivo de evitar a propagação de doenças por sua atuação no controle do exercício profissional e do saneamento (GERMANO, 2011).

A Constituição Federal de 1988 afirma que a saúde é um direito social e que o meio de concretização desse direito é o Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 1988).

A Vigilância Sanitária, que possui caráter altamente preventivo, está incluída no campo de atuação do SUS, sendo definida na Lei Orgânica da Saúde como um “conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1990).

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) é um instrumento privilegiado do SUS para prevenção e promoção da saúde, por compreender ações da Vigilância Sanitária como: regulação, normatização, controle e fiscalização. Essas ações são executadas nos três níveis de governo: União, Estados, Distrito Federal e Municípios (BRASIL, 1999; ANVISA, 2015).

Fazem parte do SNVS, unidades federais, estaduais e municipais: Ministério da Saúde (MS), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Instituto

Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); Conselho Nacional de Secretários Nacionais de Saúde (CONASS); Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde (CONASEMS); Centros de Vigilância Sanitária Estaduais, do Distrito Federal e Municipais (VISAS); Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs); Conselhos Estaduais, Distrital e Municipais de Saúde, em relação às ações de vigilância sanitária (BRANCO, 2010).

A ANVISA atua como um dos braços executivos que estruturam e operacionalizam o SUS, tendo como objetivo a eliminação ou minimização do risco sanitário, e a busca da concretização do direito social à saúde (LUCCHESI, 2001).

Os laboratórios são imprescindíveis para o controle sanitário dos produtos para a saúde. Por meio de análises físicas e controle da qualidade, eles intervêm na produção científica e tecnológica, na avaliação de conformidade de produtos e na análise e gerenciamento de risco (BRANCO, 2010).

A atuação do INCQS ocorre a nível federal, já os LACENs agem a nível estadual, analisando vários produtos de interesse da saúde, incluindo água, alimentos e cosméticos (BOANOVA, 2014).

## 1.2 SISTEMA DA QUALIDADE

A qualidade em laboratórios é obtida pela execução de atividades técnicas e administrativas com organização e planejamento desde a amostragem até a saída dos resultados, visando que estes sejam precisos, exatos, rastreáveis e, conseqüentemente, confiáveis (CARDOSO, 2008).

A qualidade analítica examina os requisitos do processo analítico que garantem que os resultados produzidos pelos laboratórios atendam ao nível de qualidade desejado, controlando erros aleatórios, erros sistemáticos e erro total (OLIVEIRA; MENDES, 2011).

A acreditação é o reconhecimento formal proveniente de órgão competente que capacita o laboratório a realizar ensaios ou calibrações específicas; seus objetivos são: garantir a validade dos resultados dos ensaios; promover a aceitação desses resultados pelos usuários; facilitar o comércio nacional e/ou internacional;

identificar centros de competência; etc. Para gerenciar a qualidade, a principal norma adotada é a Norma NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005), que traz como requisitos: padrão que facilita o estabelecimento de acordos de reconhecimento mútuo entre os organismos de credenciamento nacionais; facilitar a interpretação e a aplicação dos requisitos, evitando ao máximo opiniões divergentes e conflitantes; a utilização de métodos validados; o uso de itens de ensaio para o controle laboratorial interno; a participação periódica do laboratório em programas em ensaio de proficiência e/ou comparações interlaboratoriais (CARDOSO, 2008; ROSAS, 2009).

### 1.3 ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

O avanço nos estudos de comparações interlaboratoriais se deu em 1967 com a publicação da *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA) nos EUA (OLIVEIRA; MENDES, 2011). No Brasil, a participação em Ensaio de Proficiência (EP) em laboratórios clínicos ocorreu por muito tempo em caráter voluntário, se tornando obrigatória mediante legislação em serviços de hemoterapia (RDC 343/2002) (BRASIL, 2002) e dos laboratórios clínicos (RDC 302/2005) (BRASIL, 2005). A utilização de EPs em outras áreas foi impulsionada no Brasil pelas certificações ISO série 9000 e pelo movimento metrológico conduzido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (OLIVEIRA; MENDES, 2011).

Os EP são estudos interlaboratoriais utilizados como ferramenta de avaliação externa da qualidade e demonstração da confiabilidade dos resultados analíticos para os clientes, órgãos de acreditação e regulamentadores. Servem também para identificar falhas e possibilitar a tomada de ações corretivas ou preventivas, sendo um dos itens necessários para a acreditação de ensaios pela Norma NBR ISO/IEC 17025:2005 (ABNT, 2011; OLIVEIRA; MENDES, 2011).

Os EP conduzem o laboratório à melhoria contínua do seu desempenho. Entre os seus benefícios estão: aumento da segurança do paciente; caracterização da tendência e da imprecisão dos ensaios em diferentes métodos; identificação de interferentes e quantificação dos seus efeitos em diferentes métodos;

disponibilização de informação confiável aos laboratórios para substituição de metodologias insatisfatórias; identificação de laboratórios com problemas de desempenho; reconhecimento de resultados em ensaios em nível nacional e internacional (PLEBANI et al, 2008).

Para que os resultados obtidos sejam válidos e confiáveis, a análise deve: ser executada sob um sistema de gestão da qualidade bem estabelecido; ter métodos de análise validados, procedimentos internos de controle da qualidade, participação em EP, e rastreabilidade de resultados e medições (VENÂNCIO, 2011).

O EP é gerido por uma terceira parte, o provedor, e possibilita uma comparação com o mercado ao ser valorado por múltiplos laboratórios conferindo uma maior capacidade de monitoração do erro sistemático (OLIVEIRA; MENDES, 2011).

Os requisitos gerais para competência de provedores de EP e para o desenvolvimento e operação de programas de EP estão especificados na NBR ISO/IEC 17043 (ABNT, 2011).

O EP pode ser realizado pela análise qualitativa e quantitativa. No ensaio qualitativo o desempenho do laboratório é verificado facilmente pela comparação do resultado analisado com o resultado aceito. Já no ensaio quantitativo o critério de avaliação é um pouco mais complexo e pode variar conforme o modelo de avaliação determinado, tendo o Z-score, usado historicamente em EP. O Z-score pressupõe uma distribuição normal ou gaussiana, com níveis de confiança de aproximadamente 95% e 99%, tendo seus critérios relacionados ao Z-score ([valor designado – resultado do laboratório] / desvio padrão): critérios satisfatórios ( $Z \leq 2$ ), questionáveis ( $2 < Z < 3$ ) e insatisfatórios ( $Z \geq 3$ ) (ISO, 2005; OLIVEIRA; MENDES, 2011).

Existem 38 provedores de EP na área de microbiologia de alimentos distribuídos pelo mundo. O Quadro 1 mostra essa ampla distribuição (EPTIS, 2015).

Na área de alimentos, o número de provedores de EP é reduzido e os custos cobrados para a participação nestes ensaios, em geral, são muito elevados. Desse modo, o desenvolvimento de itens de ensaio nacionais para EP na área de microbiologia de alimentos facilita a participação de laboratórios brasileiros nesses ensaios (COSTA et al, 2015).

Quadro 1 - Provedores de Ensaio de Proficiência em microbiologia de alimentos pelo mundo

| País           | Provedores de Ensaio de Proficiência |
|----------------|--------------------------------------|
| África do Sul  | 1                                    |
| Alemanha       | 4                                    |
| Argentina      | 1                                    |
| Austrália      | 3                                    |
| Bélgica        | 1                                    |
| Brasil         | 5                                    |
| Canadá         | 1                                    |
| Dinamarca      | 1                                    |
| Espanha        | 4                                    |
| Estados Unidos | 2                                    |
| França         | 4                                    |
| Holanda        | 1                                    |
| Itália         | 2                                    |
| Noruega        | 1                                    |
| Portugal       | 1                                    |
| Reino Unido    | 4                                    |
| Suécia         | 1                                    |
| Vietnã         | 1                                    |

Fonte: site EPTIS, acessado em: 10/07/2015.

#### 1.4 ITEM DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

Segundo a NBR ISO/IEC 17043 (ABNT, 2011), um item de ensaio de proficiência (IE) é uma amostra, produto, artefato, material de referência, equipamento, padrão, conjunto de dados ou outra informação utilizada pelo ensaio de proficiência. Ele é um componente essencial no controle metrológico dos dados obtidos em vários tipos de análises, na sua comparação e rastreabilidade a padrões internacionais (ARUNACHALAM et al., 2006).

Para assegurar no processo analítico um alto nível de confiabilidade dos dados gerados, o IE deve exibir uma composição da matriz similar à amostra e uma concentração apropriada do analito de interesse (VENELONOV; SAHUQUILO, 2006). Além disso, os IE devem ser suficientemente homogêneos, de forma que os laboratórios recebam analitos sem diferenças significativas em seus parâmetros, e estáveis, para que mantenham suas propriedades ao longo do tempo (BRANDÃO et al., 2013a).

A problemática envolvida na obtenção de lotes de IE homogêneos e estáveis em microbiologia é a instabilidade natural dos micro-organismos em determinadas matrizes.

Um dos mais efetivos métodos de preservação para a maioria dos micro-organismos é a liofilização, que consiste na remoção do vapor de água diretamente de amostras congeladas e secagem sob vácuo, até produção de material estável (ALCARDE; BASSO, 1997). O uso de crioprotetores nessa técnica possibilita um aumento na sobrevivência das bactérias durante um longo período na matriz (BRANDÃO et al, 2014).

#### 1.4.1 Crioprotetores

A eficácia da criopreservação pode ser afetada por múltiplos fatores, como por exemplo: espécie, tamanho e forma celular, fase e taxa de crescimento, temperatura de incubação, composição do meio de crescimento, pH, osmolaridade, teor de água e de lipídios na célula, temperatura e duração do armazenamento. Sendo que a condição mais importante é a composição do meio utilizado para suspender os micro-organismos para o congelamento (HUBÁLEK, 2003).

Ocasionalmente, é observada uma boa sobrevivência de micro-organismos congelados sem uma proteção adicional, no entanto, o uso adequado de crioprotetores geralmente aumenta consideravelmente a sobrevivência desses micro-organismos (HUBÁLEK, 2003).

Muitos agentes crioprotetores são indicados com sucesso para aumentar a resistência das células bacterianas liofilizadas, como glicerol a 10%, leite desnatado a 10%, inositol a 10%, sacarose a 10 ou 12%, rafinose a 5 ou 10% e trealose a 10% (ALCARDE; BASSO, 1997). Os crioprotetores podem ser adicionados durante o crescimento celular ou antes dos processos de congelamento e liofilização (BRANDÃO et al, 2013d).

A trealose é um dissacarídeo não redutor constituído de duas unidades de glicose que ao ser adicionado à cultura bacteriana antes da liofilização aumenta a

resistência à dessecação pela proteção da membrana citoplasmática e pela penetração e acúmulo nas células por difusão passiva (WESH; HERBET, 1999).

#### 1.4.2 Trealose endógena

A trealose é uma molécula de açúcar capaz de substituir moléculas de água intracelulares, que hidratam proteínas e membranas, atuando na prevenção da desnaturação de proteínas e na transição da fase liotrópica dos lipídeos das membranas (BRANDÃO et al, 2013d).

A trealose tem sido indicada como componente essencial para a manutenção da viabilidade de células de leveduras, fungos, bactérias, insetos e plantas sob condições de estresse (COLLA, 2008).

Algumas bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* são capazes de produzir trealose endógena para proteger a célula em resposta a condições adversas de crescimento como estresse osmótico e redução de nutrientes, como a fase estacionária e meios com reduzida concentração de nutrientes (WELSH; HERBERT, 1999). A trealose endógena acumulada protege a estrutura terciária das proteínas pela formação de pontes de hidrogênio (BRANDÃO et al, 2013d).

Para estimular a produção de trealose endógena, a bactéria pode ser cultivada em meio com mínima concentração de nutrientes como o meio Luria Bertani (LB) adicionado de 10% de NaCl (BRANDÃO et al, 2013d).

#### 1.5 TESTE DA HOMOGENEIDADE

Para a produção de um item de ensaio, o material é submetido a várias etapas de preparação, como: congelamento, secagem; redução do tamanho de partículas; estabilização; etc. (ABNT, 2012).

O lote do item de ensaio deve possuir homogeneidade aceitável de forma que as amostras recebidas pelos laboratórios não possuam diferenças significativas nas

concentrações do analito (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). Assim, para demonstrar que o lote é suficientemente homogêneo é necessário que se realize o teste da homogeneidade (ABNT, 2012).

Para a realização do teste, as amostras devem ser selecionadas aleatoriamente. O número mínimo de amostras selecionadas deve se situar entre 10 e 30 unidades; porém é recomendado que esse número não seja inferior a 10 unidades. O número ideal de amostras para o estudo da homogeneidade pode ser determinado por meio de técnicas de planejamento baseadas em métodos estatísticos (ABNT, 2012). A avaliação estatística da homogeneidade de itens de ensaio microbiológicos normalmente utiliza a análise de variância (ANOVA), de acordo com o Protocolo Internacional Harmonizado (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006).

## 1.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE

Para determinar o grau de estabilidade remanescente dos itens de ensaio após a preparação ou para confirmar sua estabilidade, é realizado o estudo de estabilidade (ABNT, 2012). Mesmo materiais “estáveis” podem apresentar instabilidade devido a condições como: armazenamento e transporte (ABNT, 2012).

Este estudo identifica as possíveis variações que os analitos, dentro do mesmo lote possam sofrer, alterando a característica de homogeneidade.

De acordo com a NBR ISO GUIA 35 (ABNT, 2012b), o estudo de estabilidade é realizado em duas categorias:

- Estabilidade de armazenamento (longo prazo ou longa duração): está relacionada à instabilidade remanescente dos valores de propriedade dos IE sob condições de armazenamento na temperatura de referência e na temperatura de estocagem, este estudo identifica se o material apresenta alterações nas suas características durante o período que é mantido estocado.

- Estabilidade em curto prazo (curta duração): visa avaliar a manutenção das características dos IE sob condições ambientais diversas. O estudo em curto prazo deve ser realizado com a exposição do material a diferentes temperaturas em

diferentes intervalos de tempo, a fim de ser obter informações a respeito das condições apropriadas de estocagem e de cuidados a serem aplicados durante o transporte.

Existem dois modelos experimentais para os estudos de estabilidade (ABNT, 2012b):

- **Modelo Clássico:** permite identificar a repetibilidade nas determinações do analito ao longo do tempo, isto é, amostras individuais são analisadas sob condições idênticas, sendo medidas em tempos separados. Contudo, na utilização deste modelo há chances de variações nos resultados. A principal vantagem em relação ao modelo isócrono é que qualquer evidência de instabilidade é detectada precocemente;

- **Modelo Isócrono:** permite que as medições ocorram sob condições de repetibilidade (em uma mesma análise), onde os IE são segregados em intervalos de tempo diferentes e acondicionados sob condições idênticas, sendo medidas ao mesmo tempo. Essa condição faz com que as variações sejam menores em relação ao modelo clássico, mas sua desvantagem é que a estabilidade do material só é conhecida ao término do estudo.

Para a avaliação estatística da estabilidade é utilizada a NBR ISO GUIA 35 (ABNT, 2012), que emprega a análise de regressão linear. Caso não ocorra variação da concentração do analito em função do tempo, o material é considerado estável.

## 1.7 CACAU

O cacau já era cultivado desde os tempos pré-colombianos: pelos Astecas, no México, e pelos Maias, na América Central. Pelos Astecas, o cacauero era considerado de origem divina: eles acreditavam que o profeta Quatzalcault ensinou o povo a cultivar o cacauero tanto para fins alimentares quanto para embelezamento dos jardins da cidade de Talzitapec, por isso o cultivo do cacauero era feito com cerimônias religiosas solenes (CEPLAC, 2015).

Em sua primeira classificação binomial, feita pelo italiano Peter Martyr Vermigli, o cacauero foi nomeado como *Amygdalae pecuniariae*, que significa

“amêndoa-dinheiro” por ser moeda de intercâmbio – houve época em que um bom escravo podia ser trocado por 100 sementes de cacau. Em 1735, essa árvore teve seu nome mudado pelo sueco Carl Linnaeus, sendo até hoje chamada de *Theobroma cacao*, que significa “cacau, alimento dos deuses” (CEPLAC, 2015; VALENZUELA, 2007; WINKEL, 2013).

A *Theobroma cacao* é tipicamente neotropical, mas hoje também está distribuída nas regiões equatoriais do mundo. Esta árvore é pequena, tendo em média entre 5 e 10 metros de altura e sua copa tem de 4 a 5 metros de largura (WINKEL, 2013).

Os frutos do cacauero começam a surgir quando a árvore tem cerca de 3 anos, sendo abundantes a partir dos 8 anos; sua produção é satisfatória até os 30 anos, podendo, em condições excepcionais, chegar aos 50 anos. Essa árvore pode viver mais de 100 anos (SALVADOR, 2011).

Acredita-se que o cacau é originário das cabeceiras do Rio Amazonas, tendo se expandido em duas direções principais de forma a dar origem a dois grupos importantes: Criollo e Forastero. O Criollo se espalhou em direção ao norte, para o Rio Orinoco, entrando na América Central e Sul do México; o Forastero se espalhou pela bacia amazônica abaixo e em direção às Guianas (CEPLAC, 2015).

O cacau é classificado pelo mercado mundial em duas categorias básicas: o do tipo *Bulk* (cacau Regular ou Ordinário) e o do tipo Fino ou *Flavor* (cacau Aromático e/ou Fino). O cacau do tipo *Bulk* é produzido pela espécie botânica Forastero; já a espécie Criollo produz o cacau do tipo Fino ou *Flavor* (PEREIRA, 2009).

A África Ocidental detém cerca de 68% da produção mundial, no entanto a América vem aumentando a sua produção, especialmente o Brasil, devido ao clima favorável e aos programas de seleção de árvores resistentes às doenças fúngicas, que são a maior dificuldade no cultivo do cacauero. Assim, o Brasil é o 5º produtor de cacau do mundo ao lado da Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões (CEPLAC, 2015; SALVADOR, 2011).

## 1.8 CHOCOLATE

A origem do chocolate está na bebida “xoxocoalt”, “cacahualt” ou “chocolatl”, produzida pelas culturas pré-colombianas. Em 1527, as sementes de cacau foram levadas para Europa, e no final do século XVI, o consumo de bebida de chocolate se tornou popular. Sendo que, até o século XIX, a bebida de chocolate apresentava um aspecto visual ruim, devido à gordura que se separava e ia para a superfície; esse problema foi solucionado pelos holandeses que desenvolveram uma prensa que retirava metade da gordura do cacau, permitindo melhor aspecto à bebida (CARNEIRO, 2003).

A partir da invenção de outros equipamentos o chocolate deixou de ser considerado apenas como bebida e passou a ser consumido também na forma de tabletes sólidos (BECKETT, 2002).

O chocolate começou a ser produzido industrialmente na Alemanha, sendo que o primeiro chocolate sólido foi produzido em 1847 pela empresa *Fry and Son*. No Brasil, a primeira fábrica de chocolates foi instalada em Porto Alegre em 1891 (BECKETT, 2002; SILVA, 2011).

A partir do início do século passado, estudos começaram a serem realizados com o objetivo de conhecer melhor a composição da semente de cacau nas etapas de colheita e processamento e definir técnicas para aperfeiçoamento da qualidade do produto final (SILVA, 2011).

Atualmente, o chocolate é a forma predominante de consumo do cacau, representando cerca de 90% do mercado do cacau (DONOVAN, 2006).

O chocolate é o produto obtido com a mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa, pasta ou licor de cacau, cacau em pó e/ou manteiga de cacau, e outros ingredientes, de forma a conter, no mínimo, 25% de sólidos totais de cacau, podendo apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (ABICAB, 2015).

As gorduras do chocolate incluem a manteiga de cacau, gordura do leite e a gordura vegetal; sendo que a gordura derivada do cacau é constituída por dois ácidos graxos saturados, o ácido palmítico e o esteárico, além do ácido oleico, que é monoinsaturado (RICHTER; LANNES, 2007).

Assim, o chocolate possui grande valor nutritivo e energético; de forma que a associação entre cacau, leite e açúcar faz com que 100 g de chocolate ao leite tenha carboidratos (56 g), lipídios (34 g), proteínas (6 g), sais minerais (como potássio, cálcio, magnésio e ferro) e vitaminas (B1, B2 e PP) e 550 Kcal (CEPLAC, 2015).

Apesar do consumo de gorduras saturadas aumentar o nível plasmático de colesterol, o consumo regular de chocolate nega esse aumento, provavelmente devido ao ácido esteárico, que apresenta um efeito neutralizador sobre o metabolismo do colesterol, e o ácido oleico, que reduz a concentração plasmática do colesterol médio (RICHTER; LANNES, 2007).

Além disso, o chocolate apresenta efeitos cardiovasculares protetores devido à elevada quantidade de polifenóis (principalmente flavonoides, como a catequina e a epicatequina), apresentando atividade oxidante, efeito modulador sobre a função plaquetária (reduzindo o risco de trombose) e a inflamação, e efeito diminutivo na pressão arterial (BATISTA, 2008; GÓMEZ-JUARISTI et al, 2011).

O chocolate também apresenta a teobromina, um alcaloide do grupo das metil-xantinas que apresenta efeitos estimulantes semelhante à cafeína (BATISTA, 2008).

É um alimento consumido por 75% da população do Brasil, sendo no mundo o 4º país de maior consumo de chocolate e o 3º maior produtor desse alimento. Em 2013 as indústrias de chocolate produziram 800 mil toneladas para o setor (ABICAB, 2015).

A produção mundial de chocolate ficou acima, dos 4 bilhões de toneladas em 2012. O consumo *per capita* de chocolates no Brasil é crescente: era em torno de 300 gramas na década de 70 e atualmente está na média de 2,8 kg por pessoa ao ano (ABICAB, 2013).

As diferenças em composição, sabor e uso para o chocolate variam em cada país e refletem os gostos da população, a legislação do país e a história das indústrias dos diferentes lugares (RICHTER; LANNES, 2007). Ele pode ser combinado com produtos, lácteos, açúcares e/ou edulcorantes e outros aditivos, como: reguladores de acidez, emulsificantes, agentes flavorizantes, antioxidantes, corantes, etc. A combinação desses aditivos não deve exceder a 40% do peso total do produto acabado (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

## 1.9 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA CHOCOLATE

As toxinfecções alimentares constituem um sério problema de saúde pública. A RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001) e, para a avaliação da qualidade microbiológica de chocolate, a legislação cita os seguintes parâmetros: limite de 10 Unidades Formadoras de Colônia por Grama (UFC/g) para coliformes a 45°C, limite de 10<sup>3</sup> UFC/g para estafilococos coagulase positiva e ausência de *Salmonella* spp.

### 1.9.1 Coliformes

Os coliformes totais pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos, fermentadores de glicose e lactose, produzindo ácido e gás a partir de lactose em um período de 24 a 48 horas a 35 °C (JAY, 2005).

Mais de 20 espécies se encaixam nessa definição, encontrando-se bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais, e também por bactérias não entéricas (JAY, 2005; SILVA et al, 2010). Portanto, a presença de coliformes totais no alimento não indica necessariamente contaminação fecal ou ocorrência de enteropatógenos, no entanto, pode ser indicação de condições de higiene de alimentos frescos ou processados (SALES et al, 2015).

Os coliformes a 45°C, também chamados de coliformes termotolerantes e coliformes de origem fecal, são um subgrupo dos coliformes totais capazes de fermentar a lactose em 24 horas, com produção de gás, a 45,5 °C (FORSYTHE, 2002). Fazem parte desse grupo bactérias do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, sendo que somente a *Escherichia coli* (*E. coli*) tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos, os demais podem ser encontrados nas fezes e também podem estar presentes em outros ambientes como vegetais e solos (SALES et al, 2015).

Os coliformes termotolerantes são usados como indicadores de segurança de alimentos, sendo sua quantificação utilizada como parâmetro na avaliação da

qualidade higiênico-sanitária, fornecendo a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (SALES et al, 2015).

### 1.9.2 Estafilococos Coagulase Positiva

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae*, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, dispostos sozinhos, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados de forma semelhante a um cacho de uvas. Formam colônias cremosas e grandes (1 a 2 mm de diâmetro). São facultativos anaeróbios, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então, produzem a enzima catalase. São imóveis, não esporulados, geralmente não encapsulados, tolerantes a altas concentrações de NaCl e resistentes à bacitracina (CORDEIRO, 2011).

De acordo com o site LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*), criado por Euzéby, 49 espécies e 26 subespécies fazem parte deste gênero. Destas, as seguintes apresentam interesse potencial em microbiologia de alimentos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus intermedius*.

Os *Staphylococcus* podem ser divididos em dois grupos de acordo com a sua capacidade de produção da enzima coagulase: estafilococos coagulase positiva e estafilococos coagulase negativa (CABOCLO, 2008).

A enzima coagulase converte fibrinogênio em fibrina, coagulando o plasma sanguíneo. Assim, ela é considerada um fator de virulência, pois o coágulo isola a área infectada dificultando o acesso das células do sistema imunológico do hospedeiro às bactérias (CABOCLO, 2008; MARTINS, 2012).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é o principal causador de intoxicação alimentar estafilocócica entre os estafilococos coagulase-positiva (HENNEKINNE et al, 2010). A maioria dos indivíduos já apresentou ou vai apresentar algum tipo de infecção ou intoxicação por *S. aureus*, durante a sua vida (NASCIMENTO et al, 2001). Esta intoxicação é originada pela ingestão das enterotoxinas pré-formadas

nos alimentos e seus sintomas mais comuns são: náuseas, vômitos, cólicas e hipotermia (BRANDÃO et al, 2013a; FRANCO et al, 2002).

Para prevenção da multiplicação do *S. aureus*, deve-se usar temperaturas fora do intervalo de 7-48°C durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Esse microrganismo, geralmente, é muito tolerante a NaCl, de modo que é possível seu crescimento, embora retardado, em concentrações de até 20% (HENNEKINNE et al, 2010).

### 1.9.3 *Salmonella*

A *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bastonete Gram-negativo, não formador de esporos, anaeróbios facultativos, oxidase negativa, é móvel devido aos flagelos peritríquios, fermenta glicose formando ácido e gás, mas não fermenta lactose (com exceção de alguns sorotipos), sacarose ou salicina. Além disso, ela descarboxila a lisina, produz gás sulfídrico e utiliza o citrato como única fonte de carbono (FEITOSA et al, 2008; SILVA et al, 2010).

O gênero *Salmonella* possui duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A *Salmonella enterica* possui seis subespécies: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *salamae*, *houtenae*, *indica*. Existem atualmente 2.610 sorovares sendo que 1.547 se encontra na subespécie *enterica* (GUIBOURDENCHE et al, 2010). Dos sorovares mais comumente isolados, mais de 99% pertencem a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (FEITOSA et al, 2008).

A *Salmonella* Typhimurium e a *Salmonella* Enteritidis são os sorovares mais frequentemente isolados em humanos (FSAI, 2011). Os sorovares são diferenciados em função das estruturas antigênicas dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (FEITOSA et al, 2008).

As salmonelas se encontram amplamente distribuídas na natureza sendo o trato intestinal do homem e dos animais o principal reservatório natural. Este microrganismo é eliminado nas fezes e podem ser transmitidos pela via fecal-oral. Os quadros de infecções por *Salmonella* no homem são caracterizados por infecções intestinais que podem progredir para infecções sistêmicas (D'AOUST et al, 2007).

Muitos alimentos têm sido identificados como veículo para a transmissão desse agente patogênico para o ser humano, em particular alimentos de origem animal, assim como alimentos de origem vegetal que estejam sujeitos à contaminação fecal. Aqueles de particular importância incluem os ovos, carne de porco, carne de aves, leite, chocolate, frutas e legumes (FSAI, 2011).

#### 1.9.4 *Citrobacter freundii*

O gênero *Citrobacter* pertence à família Enterobacteriaceae e abriga 11 espécies, que são consideradas primariamente habitantes do trato intestinal de humanos e de animais (CARVALHO, 2010).

São bastonetes Gram-negativos, fermentam lactose e reduzem nitrato a nitrito (CAVA et al, 20009). O gênero *Citrobacter freundii* apresenta como uma de suas características bioquímicas a produção de sulfeto de hidrogênio, isso que dificulta a sua diferenciação de colônias de *Salmonella* spp. em meios de isolamento diferenciais, que tem o sistema de detecção de sulfeto hidrogênio como reação de diferenciação. Tendo em vista, isso indica a prova da descarboxilação da lisina como característica chave para a diferenciação de *C. freundii* dos diferentes sorovares de *Salmonella* (ROSAS, 2009).

*Citrobacter freundii* invade as células do cérebro humano, causando danos. Pode ter o gene de resistência à ampicilina, e ser capaz de resistir a antibióticos, tais como cefalosporinas  $\beta$ .Lactâmicos de primeira à terceira geração (CARVALHO, 2010). A infecção do trato gastrointestinal é a mais frequente. Os sintomas mais comuns em pacientes com infecção por *Citrobacter freundii* são: diarreia, febre, convulsões, fraqueza, icterícia e distensão abdominal (CARVALHO, 2010).

## 1.10 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Nas últimas décadas, muitos países têm reportado um aumento na incidência das doenças transmitidas após ingestão de água ou alimentos contaminados. É estimado que, a cada ano, mais de dois milhões de pessoas morram por doenças diarreicas, sendo que muitas delas morrem por doenças transmitidas por alimentos (DTA) (WHO, 2015b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

De acordo com *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), por ano, um em cada seis americanos (ou 48 milhões de pessoas) apresentam doenças transmitidas por alimentos e 3.000 morrem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; CDC, 2015).

A *Salmonella* aparece como o principal agente etiológico de surtos de origem alimentar nos EUA, (no período de 1993 a 1997), com 32.610 casos e 13 mortes (REZENDE, 2007).

A salmonelose ocorre pela ingestão de alimentos, geralmente cerca de  $10^7$  a  $10^9$  células/g de alimento, embora já tenham sido relatados casos de salmonelose com 100 células/100g de alimento. Os sintomas consistem em febre, dores abdominais, diarreia, náusea e, algumas vezes, vômitos, e comumente surgem entre 6 a 72 horas e persistem por 2 a 7 dias (WHO, 2002; JAY, 2005).

Todos os sorovares de *Salmonella* podem produzir infecção. A dose infectante depende do sorovar envolvido e varia com a idade e saúde do hospedeiro, não existindo dose específica (FEITOSA et al, 2008)

Surtos de doenças transmitidas por alimentos também podem ser causados por toxinas estafilocócicas. Na União Europeia, em 2011, foram relatados 345 surtos por essa toxina, sendo o maior número de casos na França (300 casos, 86,7%) e o menor número em Portugal (2 casos, 0,6%) (EFSA, 2013).

Para que haja intoxicação por *S. aureus*, são necessários: matérias-primas contendo enterotoxinas estafilocócicas; transferência de estafilococos da origem para os alimentos (por más práticas de higiene); composição alimentar com características físico-químicas favoráveis para a multiplicação de *S. aureus*; tempo e temperatura favoráveis e suficientes para a multiplicação de bactérias e produção de

toxinas; e ingestão de alimentos que contenham uma quantidade suficiente de toxina para provocar sintomas (HENNEKINNE et al, 2010).

Em relação ao chocolate, a salmonela e os fungos toxigênicos são os micro-organismos que mais podem afetar a qualidade microbiológica desse alimento e causar problemas à saúde pública (SILVA, 2011).

O chocolate está entre os produtos responsáveis pelos maiores surtos de salmonelose, sendo conhecidos desde o final da década de 1960 (EUROPEAN COMMISSION, 2003; D'AOUST,1977). De acordo com Werber e colaboradores (2005), o número de pessoas afetadas em surtos de salmonelose associado ao consumo de chocolate tem crescido ao longo dos anos. Em 2001-2002 ocorreu um surto por *Salmonella* Oranienburg na Alemanha e em outros países europeus, envolvendo 439 pessoas e o alimento incriminado foi chocolate produzido na Alemanha (WERBER et al, 2005).

No Reino Unido em 2006 e 2007 ocorreram dois surtos de salmonelose envolvendo chocolate de um mesmo produtor. No ano de 2006, um surto acometeu 42 pessoas e o sorovar envolvido foi Montevideo. No surto ocorrido em 2007, foram 90 pessoas doentes e o sorovar isolado foi Schwarzengrund, e o veículo suspeito foi chocolate com castanha do Brasil (HARKER et al, 2013).

A matéria-prima do chocolate é a amêndoa do cacau que é considerada a principal fonte de contaminação por *Salmonella*, pois fica exposta a micro-organismos após a colheita, durante a fermentação e no processo de secagem (PENHA; MATA, 1999; REOLON et al, 2012).

Algumas características aumentam o risco de salmonelose por consumo de chocolate, entre elas estão: a sobrevivência desse micro-organismo no produto contaminado, a dose infectante ser extremamente baixa e os ingredientes do chocolate favorecerem a colonização; embora o baixo teor de água e o alto teor de gordura do chocolate dificultem a multiplicação de enteropatógenos, eles também propiciam o aumento da resistência ao calor, assim as temperaturas atingidas no processamento do chocolate não seriam suficientes para destruir a *Salmonella* (CORDIER, 1994; REOLON et al, 2012).

## 1.11 JUSTIFICATIVA

De acordo com os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde das Doenças Transmitidas por Alimento do Brasil fornecidos pelo Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 e 2014, doces e sobremesas foram responsáveis por 443 surtos de DTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O chocolate é um tipo de alimento consumido por pessoas de todas as idades, pois além das apreciadas propriedades sensoriais, ele apresenta benefícios potenciais à saúde humana.

Tendo em vista os surtos de salmonelose devido ao consumo de chocolate, o controle microbiológico desse produto é de grande importância e os laboratórios que realizam estas análises devem garantir resultados precisos e confiáveis. Para a garantia dos resultados, é fundamental que os laboratórios tenham implantado um sistema da qualidade que determina o controle e a rastreabilidade de todas as etapas das análises, o uso de IE e a participação periódica em EP. A carência de IE no Brasil é alta, devido ao custo dos importados.

A produção de IE homogêneos e estáveis em matriz chocolate para detecção de *Salmonella* spp. e enumeração de estafilococos coagulase positiva e coliformes a 45 °C possibilitará a realização de EP visando contribuir para o aumento da confiabilidade dos resultados das análises dos laboratórios e propiciar subsídios para a identificação e solução de problemas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Desenvolver itens de ensaio em matriz chocolate, utilizando o método de liofilização, para ser utilizado em ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a análise microbiológica das amostras de chocolate em barra, granulado e em pó para verificar a presença de *Salmonella* spp., enumeração de estafilococos coagulase positiva e coliformes a 45°C;
- ✓ Avaliar a melhor matriz para ser utilizada nos itens de ensaio através da produção de lotes piloto com chocolate em barra, granulado e em pó, quanto ao aspecto, homogeneidade e estabilidade;
- ✓ Produzir dois lotes de itens de ensaio contendo *Salmonella* spp. e *Citrobacter freundii* destinados ao ensaio de pesquisa de *Salmonella* spp.,
- ✓ Produzir dois lotes de itens de ensaio destinados a enumeração de estafilococos coagulase positiva e coliformes a 45°C em matriz chocolate;
- ✓ Avaliar a qualidade dos lotes de IE produzidos através da verificação do vácuo, do teste de homogeneidade e dos estudos de estabilidade em curto e longo prazo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A Fiocruz promove a saúde através da geração e difusão do conhecimento científico, tendo o INCQS como referência nacional relativa ao controle de qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados a vigilância sanitária.

#### 3.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE CHOCOLATES

Amostras de chocolate granulado, em barra e em pó, foram escolhidas aleatoriamente provenientes de supermercados, do Estado do Rio de Janeiro, foram compradas e transportadas ao local de estudo onde foram submetidas a análises microbiológicas de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001 – ANVISA/MS (BRASIL, 2001), para verificar se estavam livres de contaminação pelos micro-organismos alvo.

As análises microbiológicas de pesquisa de *Salmonella* spp, enumeração de coliformes a 45 °C e contagem de estafilococos coagulase positiva, foram realizadas segundo as metodologias recomendadas pelo “*Bacteriological Analytical Manual*” (FDA/2011).

As informações nutricionais dos candidatos a matriz se encontram no Quadro 2.

Quadro 2: Informações nutricionais dos candidatos a matriz chocolate para item de ensaio

|                    | Chocolate em barra<br>(100g) | Chocolate granulado<br>(100g) | Chocolate em pó<br>(100g) |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Valor Energético   | 552kcal                      | 1676kcal                      | 1470kcal                  |
| Carboidratos       | 60g                          | 360g                          | 60g                       |
| Proteínas          | 4,8g                         | 3,6g                          | 11,5g                     |
| Gorduras Totais    | 33,2g                        | 25,6g                         | 7,5                       |
| Fibras Alimentares | 0g                           | Não informado                 | 14,5g                     |
| Sódio              | 36mg                         | 14,4mg                        | 0mg                       |

Fonte: Rótulo do produto.

### 3.2.1 Análise Microbiológica para Pesquisa de *Salmonella* spp.

#### Pré-enriquecimento

Para cada amostra foram pesados assepticamente 25 g em recipiente estéril, transferidos para saco plástico estéril apropriado para uso em homogeneizador (Nasco, EUA). Foram adicionados 225 mL de leite em pó desnatado reconstituído estéril e em seguida homogeneizados em aparelho “Stomacher” (Seward Fisher Scientific, CANADÁ) por 60 segundos.

O saco plástico com o homogenato foi deixado em temperatura ambiente por  $60 \pm 5$  minutos. Após esta pausa, foi homogeneizado e verificado o pH com papel indicador. Em seguida foi adicionado 0,45 mL de uma solução de verde brilhante a 1%, homogeneizado vigorosamente e incubado em estufa a  $35 \pm 2$  °C por  $24 \pm 2$  horas.

#### Enriquecimento seletivo

O pré-enriquecimento foi homogeneizado vagarosamente e transferido 0,1 mL para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio Rappaport-Vassiliadis (RV) (BD, FRANÇA) e 1 mL para um tubo de ensaio com 10 mL de caldo tetrionato (TT) (Merck, ALEMANHA). Os tubos de RV foram homogeneizados em agitador tipo

“Vortex”, e em seguida incubados a  $42 \pm 2$  °C por  $24 \pm 2$  horas; os tubos de TT foram incubados a  $35 \pm 2$  °C por  $24 \pm 2$  horas.

### **Plaqueamento seletivo**

De cada tubo de enriquecimento seletivo previamente homogeneizado, foram semeados por esgotamento, duas placas com os meios seletivo-indicadores: ágar entérico Hektoen (HK) (BD, FRANÇA) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (Merck, ALEMANHA). As placas foram incubadas em posição invertida a  $35 \pm 2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas. Em paralelo foi feito o controle dos meios de cultura utilizando-se os micro-organismos: *Salmonella* Typhimurium - INCQS 150 - ATCC 14028 (controle positivo de seleção e indicação), *E. coli* - INCQS 033 - ATCC 25922 (controle negativo de indicação) e *S.aureus* - INCQS 015 - ATCC 25923 (controle negativo de seleção).

Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas em comparação com o crescimento da cepa padrão de *S. Tiphymurium*. Foram consideradas suspeitas de *Salmonella* as colônias que apresentaram as seguintes características:

- ágar HK - colônias verde-azuladas ou azuis, com ou sem centro negro brilhoso. Culturas de *Salmonella* também podem apresentar colônias totalmente negras e brilhosas;
- ágar XLD - colônias vermelhas transparentes, com ou sem centro negro brilhoso, ou colônias totalmente negras e brilhosas.

Quando não foram detectadas colônias suspeitas em  $24 \pm 2$  horas de incubação nos meios de isolamento, foram selecionadas duas ou mais colônias não características para a identificação bioquímica. Colônias de *Salmonella* atípicas produzem coloração amarela com ou sem centro negro no ágar HK e no XLD.

### 3.2.2 Análise Microbiológica para Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP)

#### **Preparo do homogenato**

Para cada amostra foram pesados aproximadamente 50 g em recipiente estéril transferidos para saco plástico estéril apropriado para uso em homogeneizador (Nasco, EUA). Foi adicionado um volume de 50 mL de tampão fosfato de Butterfield (TB) a partir de um frasco contendo 450 mL; o saco plástico foi posicionado em aparelho “Stomacher” (Seward Fisher Scientific, CANADÁ) durante 60 segundos, em seguida foi adicionado o restante do tampão de Butterfield no saco plástico e homogeneizado manualmente.

#### **Preparo das diluições**

A partir do homogenato (diluição  $10^{-1}$ ), foram preparadas diluições seriadas transferindo 10 mL da última diluição para frascos contendo 90 mL de tampão fosfato de Butterfield. As diluições foram homogeneizadas cerca de 25 vezes.

#### **Plaqueamento**

Para cada diluição preparada foram distribuídas alíquotas de 0,1 mL na superfície de duas placas de ágar Baird Parker (Difco, EUA) O inóculo foi espalhado com o auxílio de alça de Drigalsky por toda a superfície do meio. Para o controle positivo foi semeada uma cepa de referência de *S. aureus* - INCQS 358 – ATCC 12600. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas, em posição invertida.

### 3.2.3 Análise Microbiológica para Enumeração de Coliformes a 45°C

#### **Preparo do homogenato**

Foi utilizado o homogenato e as diluições preparadas para a análise de ECP.

#### **Técnica do Número Mais Provável (NMP)**

Foram semeadas três séries de três tubos contendo meio de cultura caldo lauril sulfato triptose (LST) (Merck, ALEMANHA) com tubo de Durhan. Na primeira série, cada tubo foi semeado com 1 mL do homogenato ( $10^{-1}$ ). Na segunda série os tubos foram semeados com 1 mL da diluição  $10^{-2}$  e na terceira série os tubos foram semeados com 1 mL da diluição  $10^{-3}$ . Os tubos foram incubados a  $35 \pm 2$  °C por 24 – 48 horas para verificar a presença de gás nos tubos de Durhan e turvação.

Foram utilizadas as cepas de *E. coli* – INCQS 0033 - ATCC 25922 e *S. aureus* - INCQS 358 – ATCC 12600 como controles positivo e negativo respectivamente, do ensaio.

### 3.3 ESCOLHA DA MATRIZ

Foram feitos 18 lotes pilotos com 1 g de cada candidato à matriz (chocolate granulado, em barra e em pó) e para cada micro-organismo estudado, com quarenta frascos por lote, sendo que vinte desses frascos foram pré-liofilizados e vinte não foram.

A partir da escolha da matriz, foram preparados lotes para cada micro-organismo (*Salmonella* spp., *S. aureus* e *E. coli*) com aproximadamente 232 frascos cada lote, contendo 1 g da matriz escolhida. Também foi preparado um lote com *Citrobacter freundii* (*C. freundii*) para ser usado como controle negativo no ensaio de pesquisa de *Salmonella* spp.

### 3.4 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA E PRODUÇÃO DOS ITENS DE ENSAIO

#### 3.4.1 Verificação da Pureza

O ensaio de pureza foi realizado, pela técnica do esgotamento, em meio ágar padrão para contagem (APC). A incubação foi feita a  $35 \pm 2$  °C por 24 h. Após a incubação, foi verificada, na placa, a presença de um único tipo de colônia, caracterizando a pureza da cultura.

#### 3.4.2 *Salmonella* spp.

Para o preparo da suspensão de *Salmonella* spp. foi utilizada uma cepa de *Salmonella* depositada na coleção de pesquisa do Laboratório de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ, identificada como P3440, isolada de alimento (coxa de frango). Foram transferidos 100 µL de um criotubo contendo o micro-organismo para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) (Merck, ALEMANHA). O tubo foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

Após o período de incubação, foram transferidos 500 µL do tubo com BHI para um tubo contendo 15 mL de caldo Luria Bertani (LB) (BD, FRANÇA) com 10% de NaCl. O tubo foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 28 horas, para estimular a produção de trealose endógena.

Depois da incubação, foi colocado 1 mL da cultura em oito microtubos para centrifugação (Eppendorf, EUA) em ciclo de 8.600 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes dos oito microtubos foram descartados e os pellets de quatro microtubos foram ressuspensos com 1 mL de solução salina peptonada 0,1% (SSP 0,1%) e homogeneizados em agitador de tubos tipo vortex. A suspensão desses quatro microtubos foi utilizada para ressuspender o pellet dos outros quatro microtubos que foram recentrifugados por 10 minutos.

Os sobrenadantes dos quatro microtubos foram descartados e os pellets de dois microtubos foram ressuspensos com 1 mL de solução de trealose 100 mM (crioprotetor). O volume dos dois criotubos foi transferido para um tubo de ensaio 10 x 80 mm. Os pellets dos outros dois microtubos ficaram na cabine de segurança biológica, numa estante para posterior ajuste de concentração.

Foi realizada a leitura da concentração de células em fotolorímetro (Libra S2, Biochrom, INGLATERRA) em comprimento de onda de 520 nm, utilizando como branco a solução de trealose 100 mM. O valor de transmitância deve ser de 2% para atingir aproximadamente  $2,0 \times 10^9$  UFC/mL. Essa solução foi armazenada a 2 - 8 °C durante 30 minutos. Após essa etapa, foram realizadas três diluições 1:10 em SSP 0,1% chegando-se a uma concentração de aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Três mililitros da suspensão bacteriana foram adicionados em 297 mL de SSP 0,1% com 100 mM de trealose, resultando em uma concentração aproximada de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. A suspensão final foi homogeneizada em uma placa agitadora sem aquecimento (Corning, EUA), com o uso de um magneto, por 20 minutos em banho de gelo.

Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow, INGLATERRA) foram distribuídos 0,5 mL da suspensão bacteriana nos 210 frascos de vidro contendo 1 g da matriz escolhida.

Em seguida os frascos foram armazenados em ultrafreezer a aproximadamente -70 °C (Thermo, EUA) por 24 horas. Após esse período, foram retirados do freezer rapidamente e posicionados com as tampas entreabertas, em aparelho liofilizador (Liotop, BRASIL), onde foram submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas.

Para verificar a concentração final da suspensão utilizada na contaminação dos frascos, foram preparadas três diluições decimais em SSP 0,1%, sendo as duas últimas diluições utilizadas para a contagem. De cada diluição, 1 mL foi colocado em duas placas adicionadas do meio APC (Merck, ALEMANHA). Essas placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas. A contagem das placas foi realizada em contador de colônias (Phoenix Lufarco, BRASIL).

### 3.4.3 *Staphylococcus aureus*

Para o preparo da suspensão de *S. aureus* foi utilizada uma cepa de *Staphylococcus aureus*, depositada na coleção de pesquisa do Laboratório de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ, identificada como P4283, isolada de alimento (queijo tipo ricota). Foram transferidos 100 µL de um criotubo contendo o micro-organismo para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI (Merck, ALEMANHA). O tubo foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

Depois da incubação, foi colocado 1 mL da cultura em oito microtubos para centrifugação (Eppendorf, EUA) em ciclo de 8.600 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes dos oito microtubos foram descartados e os pellets de quatro microtubos foram ressuspensos com 1 mL de SSP 0,1% e homogeneizados em agitador de tubos tipo vortex. A suspensão desses quatro microtubos foi utilizada para ressuspender o pellet dos outros quatro microtubos que foram recentrifugados por 10 minutos.

Os sobrenadantes dos quatro microtubos foram descartados e os pellets de dois microtubos foram ressuspensos com 1 mL de solução de sacarose 100 mM (crioprotetor). O volume dos dois criotubos foi transferido para um tubo de ensaio 10 x 80 mm. Os pellets dos outros dois microtubos ficaram na cabine de segurança biológica, numa estante para posterior ajuste de concentração.

Foi realizada a leitura da concentração de células em fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, INGLATERRA) em comprimento de onda de 520 nm, utilizando como branco a solução de sacarose 100 mM. O valor de transmitância deve ser de 2% para atingir aproximadamente  $2,0 \times 10^9$  UFC/mL. Foram realizadas duas diluições 1:10 em SSP 0,1%, chegando a uma concentração de aproximadamente  $2,0 \times 10^7$  UFC/mL.

Três mililitros da suspensão bacteriana foram adicionados em 297 mL de SSP 0,1% com 100 mM de sacarose, resultando em uma concentração aproximada de  $2 \times 10^5$  UFC/mL. A suspensão final foi homogeneizada em uma placa agitadora sem aquecimento (Corning, EUA), com o uso de um magneto, por 20 minutos em banho de gelo.

Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow, INGLATERRA) foram distribuídos 0,5 mL da suspensão bacteriana nos 232 frascos de vidro contendo 1g da matriz escolhida.

Em seguida os frascos foram armazenados em ultrafreezer a aproximadamente -70 °C (Thermo, EUA) por 24 horas. Após esse período, foram retirados do freezer rapidamente, posicionados com as tampas entreabertas, em aparelho liofilizador (Liotop, BRASIL), onde foram submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas.

Para verificar a concentração final da suspensão utilizada na contaminação dos frascos, foram preparadas três diluições decimais em SSP 0,1%, sendo as duas últimas diluições foram utilizadas para a contagem. De cada diluição, 1 mL foi colocado em duas placas adicionadas do meio APC. Essas placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas. A contagem das placas foi realizada em contador de colônias (Phoenix Lufesco, BRASIL).

#### 3.4.4 *Escherichia coli*

Para o preparo da suspensão de *E. coli* foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli*, depositada na coleção de pesquisa do Laboratório de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ, identificada como P4328, isolada de alimento (alface *in natura*). Foram transferidos 100 µL de um criotubo contendo o micro-organismo para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI (Merck, ALEMANHA). O tubo foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

Após o período de incubação, foram transferidos 500 µL do tubo com BHI para um tubo contendo 15 mL de caldo LB com 10% de NaCl. O tubo foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 28 horas, para estimular a produção de trealose endógena.

Depois da incubação, foi colocado 1 mL da cultura em oito microtubos para centrifugação (Eppendorf, EUA) em ciclo de 8.600 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes dos oito microtubos foram descartados e os pellets de quatro microtubos foram ressuspensos com 1 mL de SSP 0,1% e homogeneizados em

agitador de tubos tipo vortex. A suspensão desses quatro microtubos foi utilizada para ressuspender o pellet dos outros quatro microtubos que foram recentrifugados por 10 minutos.

Os sobrenadantes dos quatro microtubos foram descartados e os pellets de dois microtubos foram ressuspensos com 1 mL de solução de trealose 100 mM (crioprotetor). O volume dos dois criotubos foi transferido para um tubo de ensaio 10 x 80 mm. Os pellets dos outros dois microtubos ficaram na cabine de segurança biológica, numa estante para posterior ajuste de concentração.

Foi realizada a leitura da concentração de células em fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, INGLATERRA) em comprimento de onda de 520 nm, utilizando como branco a solução de trealose 100 mM. O valor de transmitância deve ser de 2% para atingir aproximadamente  $2,0 \times 10^9$  UFC/mL. Essa solução foi armazenada a  $2 - 8$  °C durante 30 minutos. Após essa etapa foram realizadas três diluições 1:10 em SSP 0,1%, chegando a uma concentração de  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Três mililitros da suspensão bacteriana foram adicionados em 297 mL de SSP 0,1% com 100 mM de sacarose resultando em uma concentração aproximada de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. A suspensão final foi homogeneizada em uma placa agitadora sem aquecimento (Corning, EUA), com o uso de um magneto, por 20 minutos em banho de gelo.

Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow, INGLATERRA) foram distribuídos 0,5 mL da suspensão bacteriana nos 232 frascos de vidro contendo 1 g da matriz escolhida. Em seguida os frascos foram armazenados em ultrafreezer a aproximadamente  $-70$  °C (Thermo, EUA) por 24 horas. Após esse período, foram retirados do freezer rapidamente, posicionados com as tampas entreabertas, em aparelho liofilizador (Liotop, BRASIL), onde foram submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas.

Para verificar a concentração final da suspensão utilizada na contaminação dos frascos, foram preparadas três diluições decimais em SSP 0,1%, sendo as duas últimas diluições utilizadas para a contagem. De cada diluição, 1 mL foi colocado em duas placas adicionadas do meio APC (Difco, EUA). Essas placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas. A contagem das placas foi realizada em contador de colônias (Phoenix Lufesco, BRASIL).

### 3.4.5 *Citrobacter freundii*

Para o preparo da suspensão de *C. freundii* foi utilizada uma cepa de *Citrobacter freundii*, depositada na coleção de pesquisa do Laboratório de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ, identificada como P4511, isolada de alimento (hortaliça *in natura*). Foram transferidos 100  $\mu$ L de um criotubo contendo o micro-organismo para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI (Merck, ALEMANHA). O tubo foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

Após o período de incubação, foram transferidos 500  $\mu$ L do tubo com BHI para um tubo contendo 15 mL de caldo LB com 10% de NaCl. O tubo foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 28 horas, para estimular a produção de trealose endógena.

Depois da incubação, foi colocado 1 mL da cultura em oito microtubos para centrifugação (Eppendorf, EUA) em ciclo de 8.600 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes dos oito microtubos foram descartados e os pellets de quatro microtubos foram ressuspensos com 1 mL de SSP 0,1% e homogeneizados em agitador de tubos tipo vortex. A suspensão desses quatro microtubos foi utilizada para ressuspender o pellet dos outros quatro microtubos que foram recentrifugados por 10 minutos.

Os sobrenadantes dos quatro microtubos foram descartados e os pellets de dois microtubos foram ressuspensos com 1 mL de solução de trealose 100 mM (crioprotetor). O volume dos dois criotubos foi transferido para um tubo de ensaio 10 x 80 mm. Os pellets dos outros dois microtubos ficaram na cabine de segurança biológica, numa estante para posterior ajuste de concentração.

Foi realizada a leitura da concentração de células em fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, INGLATERRA) em comprimento de onda de 520 nm, utilizando como branco a solução de trealose 100 mM. O valor de transmitância deve ser de 2% para atingir aproximadamente  $2,0 \times 10^9$  UFC/mL. Essa solução foi armazenada na geladeira durante 30 minutos. Após essa etapa foram realizadas três diluições 1:10 em SSP 0,1%, chegando-se a uma concentração de aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Três mililitros da suspensão bacteriana foram adicionados em 297 mL de SSP 0,1% com 100 mM de trealose resultando em uma concentração aproximada de

$1 \times 10^4$  UFC/mL. A suspensão final foi homogeneizada em uma placa agitadora sem aquecimento (Corning, EUA), com o uso de um magneto, por 20 minutos em banho de gelo.

Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow, INGLATERRA) foram distribuídos 0,5 mL da suspensão bacteriana nos 210 frascos de vidro contendo 1g da matriz escolhida.

Em seguida os frascos foram armazenados em ultrafreezer a aproximadamente  $-70$  °C (Thermo, EUA) por 24 horas. Após esse período, foram retirados do freezer rapidamente, posicionados com as tampas entreabertas, em aparelho liofilizador (Liotop, BRASIL), onde foram submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas.

Para verificar a concentração final da suspensão utilizada na contaminação dos frascos, foram preparadas três diluições decimais em SSP 0,1%, as duas últimas diluições foram utilizadas para a contagem. De cada diluição 1 mL foi colocado em duas placas adicionadas do meio APC. Essas placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas. A contagem das placas foi realizada em contador de colônias (Phoenix Lufarco, BRASIL).

#### 3.4.6 Inspeção Visual

Após a retirada dos frascos do liofilizador (Liotop, BRASIL), foi realizada uma inspeção visual a fim de verificar o aspecto das amostras liofilizadas.

#### 3.4.7 Verificação do Vácuo

Após a retirada dos frascos do liofilizador (Liotop, BRASIL) foi realizada a verificação de vácuo de todos os frascos do lote, utilizando-se aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil, BRASIL), para avaliar a eficiência do processo de liofilização. Os frascos com vácuo apresentam uma coloração rosa ou

roxa durante a leitura. Os frascos com vácuo foram lacrados, identificados e estocados a temperatura de -20 °C e -70 °C.

### 3.5 TESTE DA HOMOGENEIDADE DO LOTE FINAL

Para o teste da homogeneidade foram selecionados aleatoriamente 21 frascos do lote de *Salmonella* spp., 16 frascos do lote de *Citrobacter freundii*, 32 frascos do lote de *Staphylococcus aureus* e 32 frascos do lote de *Escherichia coli*. A análise de cada frasco foi realizada em duplicata.

Após a retirada dos frascos do freezer, estes foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos. Os líofilos foram reconstituídos com 1 mL de SSP 0,1% e mantidos em repouso por 15 minutos.

Para *Salmonella* spp. e *C. freundii*, para cada micro-organismo foi realizada uma diluição 1:10 e em seguida foi transferido um volume de 1 mL para a superfície de duas placas estéreis e foi acrescentado o ágar vermelho neutro cristal violeta bile glicose (VRBG) (Difco, EUA) em dupla camada, conforme a técnica *pour plate*, com incubação a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

Para *S. aureus* foi realizada uma diluição 1:10 e em seguida foi transferido um volume de 0,1 mL para a superfície de duas placas contendo ágar Baird-Parker (BP) (Difco, EUA) utilizando-se a alça de Drigalsky para o espalhamento, com incubação a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas.

Para *E. coli*, foi realizada uma diluição 1:10 e em seguida foi transferido um volume de 1 mL para a superfície de duas placas e foi acrescentado o ágar vermelho neutro cristal violeta bile lactose (VRBA) (Difco, EUA) em dupla camada, conforme a técnica *pour plate*, com incubação a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas.

### 3.5.1 Avaliação Estatística da Homogeneidade

O Protocolo Internacional Harmonizado (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) indica a utilização da análise de variância (ANOVA) para determinação do grau de homogeneidade.

Para a eliminação de valores dispersos foi realizado o teste de Cochran. O valor de  $C_{\text{calculado}}$  é determinado pela Equação 1.

$$C_{\text{Calculado}} = \frac{A_{\text{máx}}^2}{\sum A_i^2} \quad (1)$$

Onde:  $A_{\text{máx}}^2$  = amplitude máxima.

$\sum A_i^2$  = somatório das amplitudes ao quadrado.

O valor do  $C_{\text{calculado}}$  foi comparado com o valor tabelado ( $C_{\text{crítico}}$ ) correspondente ao número de amostras analisadas, utilizando o intervalo de confiança de 95%. Os valores onde  $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$  foram aceitos.

A análise da variância (ANOVA) foi calculada pela Equação 2.

$$S_{\text{an}}^2 = \frac{\sum A_i^2}{2n} \quad (2)$$

Onde:  $S_{\text{an}}^2$  = variância analítica.

$\sum A_i^2$  = somatório das amplitudes ao quadrado.

$n$  = número de amostras avaliadas.

Foi calculada a variância das somas entre as amostras, conforme a Equação 3.

$$V_s = \frac{\sum (S_i - S_{\text{médio}})^2}{(m - 1)} \quad (3)$$

Onde:  $V_s$  = variância das somas entre as amostras.

$S_i$  = somatório das duas contagens de cada amostra.

$S_{\text{médio}}$  = média das somas.

$m-1$  = grau de liberdade.

Foram calculadas as variâncias entre amostras, de acordo com a Equação 4.

$$S_{am}^2 = \frac{\frac{V_s}{2} - S_{an}^2}{2} \quad (4)$$

Onde:  $S_{am}^2$  = variâncias entre amostras.

$V_s$  = variância das somas entre as amostras.

$S_{an}^2$  = variância analítica.

Em caso de resultado negativo, considerou-se  $S_{am}^2 = 0$ .

Foi atribuído o valor de  $0,25 \log_{10}$  da concentração de células para o desvio padrão alvo. Foi calculado o desvio padrão tolerável conforme a Equação 5.

$$\sigma_{alt}^2 = (0,3 \cdot \sigma_p)^2 \quad (5)$$

Onde:  $\sigma_{alt}^2$  = desvio padrão tolerável

$\sigma_p$  = desvio padrão alvo.

A partir do desvio padrão tolerável, foi realizado o cálculo do  $C_{critico}$  de acordo com a Equação 6.

$$C_{critico} = F1 \cdot \sigma_{alt}^2 + F2 \cdot S_{an}^2 \quad (6)$$

Os valores de F1 e F2 variam de acordo com o número de unidades analisadas em duplicata, estando representados na tabela 1.

Tabela 1: Valores de F1 e F2 para o ensaio de homogeneidade de acordo com o número de unidades analisadas.

| n  | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13   | 14  | 15  | 16  | 17  | 18  | 19  | 20   |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| F1 | 2,1 | 2,0 | 1,9 | 1,8 | 1,8 | 1,7 | 1,75 | 1,7 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,59 |
| F2 | 1,4 | 1,2 | 1,1 | 1,0 | 0,9 | 0,8 | 0,8  | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,57 |

Fonte: Protocolo Harmonizado (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006).

A amostra foi considerada suficientemente homogênea quando  $C_{\text{critico}} > S^2_{\text{am}}$ . Caso contrário amostra foi considerada insuficientemente homogênea.

### 3.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO LOTE FINAL

O estudo da estabilidade foi realizado em longa e curta duração.

#### 3.6.1 Estudo da Estabilidade em Curta Duração

Esse estudo foi realizado nas temperaturas de 4 e 35 °C com objetivo de simular o transporte aos laboratórios participantes de um EP. A análise foi realizada de acordo com o modelo isócrono seguindo os critérios já citado, da NBR ISO GUIA 35 (ABNT, 2012). Num período de quatro dias, foram selecionados por dia aleatoriamente, dois frascos de cada IE produzido que estavam estocados a -70 °C. Estes foram acondicionados em embalagem própria para transporte de material biológico (Concepta, BRASIL). No quarto dia (dia zero), os frascos foram analisados ao mesmo tempo, sob as mesmas condições de análise a fim de verificar se houve alterações nas características. A enumeração dos micro-organismos foi realizada de acordo com a metodologia descrita no teste da homogeneidade.

### 3.6.2 Estudo da Estabilidade em Longa Duração

Esse estudo foi realizado nas temperaturas de referência (-70 °C) e de armazenamento (-20 °C), de acordo com o modelo clássico, seguindo os critérios da NBR ISO GUIA 35 (ABNT, 2012).

Dois frascos de cada IE produzido que estavam estocados a -70 °C foram selecionados aleatoriamente, e analisados para a enumeração dos micro-organismos de acordo com a metodologia descrita no teste da homogeneidade, num período de 26 semanas.

A análise na temperatura de -20 °C foi realizada de acordo com o modelo clássico para simular a estocagem do IE nos laboratórios. Para isso, num período de cinco semanas, foram selecionados a cada sete dias aleatoriamente, dois frascos de cada IE produzido que estavam estocados a -20 °C, e analisados para a enumeração dos micro-organismos de acordo com a metodologia descrita no teste da homogeneidade.

### 3.6.3 Avaliação Estatística do Estudo da Estabilidade

Essa avaliação foi realizada segundo a NBR ISO GUIA 35 (ABNT, 2012b), a partir da análise da regressão linear dos valores de concentração dos analitos. Os resultados de contagem em UFC/g de cada frasco foram convertidos em  $\log_{10}$  para realização das análises estatísticas. Esses valores de  $\log_{10}$  foram plotados no eixo Y e correlacionados à variável tempo de estudo posicionada no eixo X. Linhas de tendência foram traçadas para a observação da dispersão dos dados.

O material foi considerado estável quando a inclinação da reta não for significativa, ou seja, a concentração bacteriana não alterar em função do tempo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

As análises microbiológicas das amostras de chocolate granulado, em barra e em pó para pesquisa de *Salmonella spp.*, estafilococos coagulase positiva e coliformes 45 °C, indicaram que as amostras não continham os micro-organismos alvo do estudo, sendo consideradas satisfatórias para utilização como matrizes para a produção de um candidato a item de ensaio.

### 4.2 ESCOLHA DA MATRIZ

A escolha do candidato a matriz (chocolate granulado, em barra e em pó) foi realizada a partir da comparação dos lotes piloto das diferentes matrizes com e sem pré-liofilização (Quadro 3).

Quadro 3 - Comparação dos resultados dos lotes piloto produzidos com os três diferentes tipos de chocolate candidatos à matriz para produção de itens de ensaio

| Micro-organismo                  | Lote | Antes da liofilização |                      | Após a liofilização |                      | Homogeneidade |                   |               | Estabilidade             |               |                         |                          |               |                         |               |
|----------------------------------|------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------|-------------------|---------------|--------------------------|---------------|-------------------------|--------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
|                                  |      | N.º UFC g / frasco    | N.º log UFC / frasco | N.º UFC g / frasco  | N.º log UFC / frasco | Média UFC g-1 | Média log UFC g-1 | Resultado     | -70°C                    |               |                         | -20°C                    |               |                         |               |
|                                  |      |                       |                      |                     |                      |               |                   |               | Coefficiente angular (a) | Tempo (dias)  | Resultado               | Coefficiente angular (a) | Tempo (dias)  | Resultado               |               |
| <i>Salmonella</i>                | CBNL | 1015                  | 3,01                 | 1160                | 3,06                 | 91,5          | 1,96              | Não homogêneo | -0,00053                 | 69            | Suficientemente estável | -0,00247                 | 69            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CBL  | 1015                  | 3,01                 | 2060                | 3,31                 | 69,5          | 1,84              | Homogêneo     | -0,001192                | 69            | Suficientemente estável | -0,001548                | 69            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CGNL | 1015                  | 3,01                 | 400                 | 2,80                 | 137           | 2,14              | Homogêneo     | -0,001266                | 69            | Suficientemente estável | -0,003929                | 69            | Não estável             |               |
|                                  | CGL  | 1015                  | 3,01                 | 1900                | 3,28                 | 106           | 2,03              | Homogêneo     | -0,001766                | 69            | Suficientemente estável | -0,001725                | 69            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CPL  | 1015                  | 3,01                 | Sem crescimento     | -                    | Não realizado | -                 | Não realizado | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado |
|                                  | CPNL | 1015                  | 3,01                 | Sem crescimento     | -                    | Não realizado | -                 | Não realizado | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado |
| <i>Escherichia coli</i>          | CBNL | 17100                 | 4,23                 | 1470                | 3,17                 | 653           | 2,81              | Homogêneo     | 0,002343                 | 70            | Suficientemente estável | -0,001819                | 70            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CBL  | 17100                 | 4,23                 | 1830                | 3,26                 | 140,5         | 2,15              | Não homogêneo | 0,005967                 | 70            | Suficientemente estável | 0,012048                 | 70            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CGNL | 17100                 | 4,23                 | 1480                | 3,17                 | 201,5         | 2,30              | Homogêneo     | 0,00364                  | 70            | Suficientemente estável | 0,004367                 | 70            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CGL  | 17100                 | 4,23                 | 1350                | 3,13                 | 459           | 2,66              | Homogêneo     | -0,000605                | 70            | Suficientemente estável | -0,002359                | 70            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CPL  | 17100                 | 4,23                 | Sem crescimento     | -                    | Não realizado | -                 | Não realizado | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado |
|                                  | CPNL | 17100                 | 4,23                 | Sem crescimento     | -                    | Não realizado | -                 | Não realizado | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado |
| Estafilococos coagulase positiva | CBNL | 31500                 | 4,50                 | 5900                | 3,77                 | 3450          | 3,54              | Homogêneo     | 0,000369                 | 70            | Suficientemente estável | 0,001195                 | 70            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CBL  | 31500                 | 4,50                 | 4900                | 3,69                 | 3545          | 3,55              | Não homogêneo | 0,000666                 | 70            | Suficientemente estável | -0,000811                | 70            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CGNL | 31500                 | 4,50                 | 10600               | 4,03                 | 5300          | 3,72              | Homogêneo     | 0,002726                 | 70            | Suficientemente estável | 0,001416                 | 70            | Suficientemente estável |               |
|                                  | CGL  | 31500                 | 4,50                 | Não produzido       | -                    | Não realizado | -                 | Não realizado | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado |
|                                  | CPL  | 31500                 | 4,50                 | 3000                | 3,48                 | 3115          | 3,49              | Homogêneo     | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado |
|                                  | CPNL | 31500                 | 4,50                 | 6900                | 3,84                 | 4595          | 3,66              | Não homogêneo | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado            | Não realizado | Não realizado           | Não realizado |

Legenda: CBNL – chocolate em barra não-lioofilizado; CBL – chocolate em barra liofilizado; CGNL – chocolate granulado não-lioofilizado; CGL – chocolate granulado liofilizado; CPNL – chocolate em pó não-lioofilizado; CPL – chocolate em pó liofilizado.

Conforme os dados do Quadro 3 foi observado que o processo de pré-liofilização não resultou em diferenças significativas no número de UFC/g. Desse modo optou-se por não realizar o processo de pré-liofilização na matriz. O chocolate em pó não apresentou crescimento dos micro-organismos *Salmonella* e *E. coli*, sendo assim, esse candidato à matriz foi descartado.

O chocolate em barra foi descartado pois não obteve resultado suficientemente homogêneo nos três micro-organismos estudados. Já o chocolate granulado além de ser de fácil manuseio, apresentou-se suficientemente homogêneo e estável, por isso foi escolhido como matriz para a produção dos lotes finais dos IE, sem pré-liofilização.

#### 4.2.1 Inspeção visual

Foi realizada a inspeção visual das amostras de chocolate granulado, sendo verificado que todas as amostras apresentaram aspecto satisfatório.

### 4.3 PRODUÇÃO DOS ITENS DE ENSAIO

#### 4.3.1 Verificação da pureza

Todos os quatro lotes apresentaram resultados satisfatórios na avaliação da pureza.

#### 4.3.2 Análise da Concentração Celular Durante o Preparo dos IE

O resultado da concentração celular das suspensões de micro-organismos utilizadas na contaminação dos frascos de cada lote se encontra na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração das suspensões dos micro-organismos na produção dos diferentes lotes de itens de ensaio em matriz chocolate granulado.

| Micro-organismos             | Início da contaminação (UFC/g) | Concentração na matriz (UFC/g) |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Salmonella</i> spp.       | $1,2 \times 10^4$              | $1,1 \times 10^3$              |
| <i>S. aureus</i>             | $1,9 \times 10^5$              | $9,6 \times 10^4$              |
| <i>Escherichia coli</i>      | $1,9 \times 10^4$              | $1,6 \times 10^3$              |
| <i>Citrobacter freundii.</i> | $1,8 \times 10^4$              | $1,7 \times 10^3$              |

Legenda: UFC/g – unidade formadora de colônias por grama.

#### 4.3.3 Verificação do vácuo

Os quatro lotes dos itens de ensaio produzidos apresentaram vácuo em 100% dos frascos, indicando que o processo de liofilização foi satisfatório.

#### 4.4 TESTE DA HOMOGENEIDADE

Os resultados referentes ao teste da homogeneidade estão apresentados nas Tabelas 3 a 6.

Tabela 3 - Contagem das UFC do teste de homogeneidade do lote de item de ensaio de *Salmonella* spp. em matriz chocolate granulada.

| Item de Ensaio (Frasco) | Log <sub>10</sub> x (unidades formadoras de colônias/grama) |            |
|-------------------------|---|------------|
|                         | Contagem 1  | Contagem 2 |
| 2                       | 3,17  | 3,03       |
| 14                      | 326   | 312        |
| 21                      | 321   | 312        |
| 31                      | 307   | 296        |
| 43                      | 303   | 296        |
| 50                      | 308   | 290        |
| 60                      | 313   | 272        |
| 72                      | 314   | 294        |
| 79                      | 311   | 298        |
| 89                      | 291   | 291        |
| 101                     | 300   | 283        |
| 108                     | 320   | 314        |
| 118                     | 303   | 302        |
| 130                     | 286   | 272        |
| 137                     | 282   | 278        |
| 147                     | 287   | 284        |
| 159                     | 273   | 272        |
| 166                     | 287   | 281        |
| 176                     | 298   | 288        |
| 188                     | 276   | 275        |
| 195                     | 279   | 272        |

Desvio-padrão alvo = 0,25.  
Desvio-padrão analítico = 0,097437835.  
Variância entre amostras =0,01550574 .  
Valor crítico =0,025 .

**Resultado: Não homogêneo.**

Legenda: log<sub>10</sub> – logaritmo de base 10.

Tabela 4 - Contagem das UFC do teste de homogeneidade do lote de item de ensaio de *S. aureus* em matriz chocolate granulada.

| Item de Ensaio (Frasco) | Log10 x (unidades formadoras de colônias/grama) |            |
|-------------------------|---|------------|
|                         | Contagem 1                                      | Contagem 2 |
| 1                       | 4,16  | 4,14       |
| 7                       | 4,12  | 4,08       |
| 14                      | 4,09  | 4,00       |
| 26                      | 4,16  | 4,11       |
| 30                      | 4,07  | 4,06       |
| 36                      | 4,17  | 4,16       |
| 43                      | 4,17  | 4,05       |
| 55                      | 4,07  | 4,06       |
| 59                      | 4,15  | 4,10       |
| 65                      | 4,03  | 4,02       |
| 72                      | 4,08  | 4,03       |
| 84                      | 4,10  | 4,05       |
| 88                      | 4,13  | 4,11       |
| 94                      | 4,08  | 4,05       |
| 101                     | 4,06  | 4,03       |
| 113                     | 4,19  | 4,11       |
| 117                     | 4,00  | 3,99       |
| 123                     | 4,19  | 4,09       |
| 130                     | 4,04  | 4,05       |
| 142                     | 4,12  | 4,02       |
| 146                     | 4,13  | 4,12       |
| 152                     | 4,03  | 3,92       |
| 159                     | 4,02  | 4,01       |
| 171                     | 4,11  | 4,06       |
| 175                     | 4,03  | 3,88       |
| 181                     | 4,15  | 4,06       |
| 188                     | 4,19  | 4,18       |
| 200                     | 4,08  | 4,03       |
| 204                     | 4,20  | 4,03       |
| 210                     | 4,11  | 4,06       |
| 217                     | 4,03  | 3,99       |
| 229                     | 4,08  | 4,08       |

Desvio-padrão alvo = 0,25.

Desvio-padrão analítico = 0,037490038 (ciclo 1); 0,055693539 (ciclo 2).

Variância entre amostras = 0,00120318 (ciclo 1); 0,00238060 (ciclo 2) .

Valor crítico = 0,025 .

**Resultado: Suficientemente homogêneo.**

Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10.

Tabela 5 - Contagem das UFC do teste de homogeneidade do lote de item de ensaio de *Escherichia coli* em matriz chocolate granulado.

| Item de Ensaio (Frasco) | Log10 x (unidades formadoras de colônias/grama) |            |
|-------------------------|---|------------|
|                         | Contagem 1                                      | Contagem 2 |
| 2                       | 3,13  | 3,06       |
| 6                       | 3,02  | 3,00       |
| 17                      | 3,04  | 3,00       |
| 29                      | 3,20  | 3,16       |
| 31                      | 3,02  | 2,95       |
| 35                      | 3,00  | 2,95       |
| 46                      | 3,05  | 3,02       |
| 58                      | 2,99  | 2,96       |
| 60                      | 2,99  | 2,95       |
| 64                      | 3,00  | 3,01       |
| 75                      | 2,96  | 2,97       |
| 87                      | 2,95  | 2,97       |
| 89                      | 3,08  | 3,03       |
| 93                      | 3,08  | 3,00       |
| 104                     | 3,01  | 2,98       |
| 116                     | 3,09  | 3,06       |
| 118                     | 3,17  | 3,16       |
| 122                     | 3,08  | 3,00       |
| 133                     | 3,08  | 3,00       |
| 145                     | 2,96  | 2,95       |
| 147                     | 3,00  | 3,02       |
| 151                     | 3,05  | 3,02       |
| 162                     | 3,00  | 2,96       |
| 174                     | 2,98  | 2,95       |
| 176                     | 2,99  | 2,97       |
| 180                     | 3,00  | 2,99       |
| 191                     | 2,98  | 2,96       |
| 203                     | 3,02  | 2,99       |
| 205                     | 3,07  | 3,06       |
| 209                     | 3,04  | 3,00       |
| 220                     | 3,00  | 2,96       |
| 232                     | 3,10  | 3,11       |

Desvio-padrão alvo = 0,25.

Desvio-padrão analítico = 0,029753406 (ciclo 1); 0,025140003 (ciclo 2) .

Variância entre amostras = 0,00282416 (ciclo 1); 0,00269479 (ciclo 2) .

Valor crítico = 0,025 .

**Resultado: Suficientemente Homogêneo.**

Legenda: log<sub>10</sub> – logaritmo de base 10.

Tabela 6 - Contagem das UFC do teste de homogeneidade do lote de item de ensaio de *Citrobacter freundii* em matriz chocolate granulada.

| Item de Ensaio (Frasco) | Log10 x (unidades formadoras de colônias/grama) |            |
|-------------------------|---|------------|
|                         | Contagem 1                                      | Contagem 2 |
| 2                       | 3,02  | 3,00       |
| 5                       | 3,00  | 2,95       |
| 12                      | 3,01  | 3,01       |
| 28                      | 3,03  | 3,00       |
| 31                      | 3,14  | 3,06       |
| 34                      | 3,05  | 2,95       |
| 41                      | 2,98  | 2,95       |
| 57                      | 2,95  | 2,93       |
| 60                      | 3,06  | 3,03       |
| 63                      | 3,12  | 3,05       |
| 70                      | 3,13  | 3,10       |
| 86                      | 3,00  | 3,00       |
| 89                      | 2,98  | 2,96       |
| 92                      | 3,02  | 3,00       |
| 99                      | 3,06  | 3,00       |
| 115                     | 2,99  | 2,98       |

Desvio-padrão alvo = 0,25.

Desvio-padrão analítico = 0,029971519.

Variância entre amostras = 0,00200947 .

Valor crítico = 0,025.

**Resultado: Suficientemente Homogêneo.**

Legenda: log<sub>10</sub> – logaritmo de base 10.

Desse modo, pode-se observar que o estudo de homogeneidade realizado para os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. freundii* não indicou *outliers* (valores aberrantes), sendo esses considerados suficientemente homogêneos de acordo com o Protocolo Harmonizado. O mesmo não aconteceu no estudo de homogeneidade do lote referente à *Salmonella* spp.

#### 4.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE

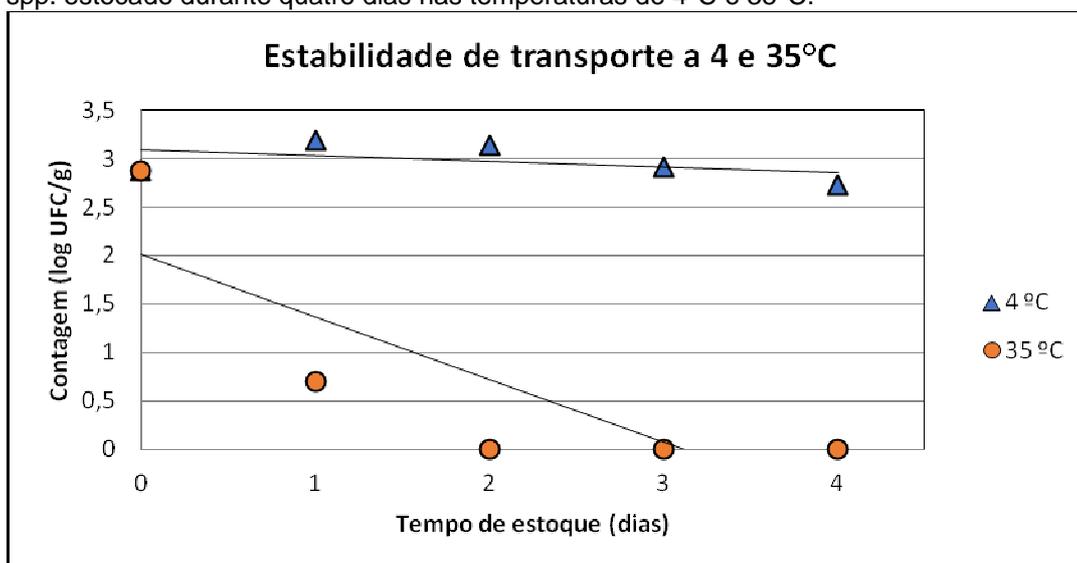
As flutuações nas concentrações de *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* e *C. freundii* foram avaliadas nas temperaturas de referência (-70 °C) e de armazenamento (-20 °C) pelo modelo clássico e para transporte (4°C e 35°C) pelo modelo isócrono. Os resultados referentes ao estudo da estabilidade estão representados nas Tabelas 7 a 10 e nas Figuras 1 a 4.

Tabela 7 - Contagem das UFC do estudo de estabilidade em curto prazo (transporte) do lote de item de ensaio de *Salmonella* spp. estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C.

| Dias                | Contagem (UFC/g) |         |
|---------------------|------------------|---------|
|                     | 4 °C             | 35 °C   |
| 0                   | 758              | 758     |
| 1                   | 1555             | 5       |
| 2                   | 1388             | 1       |
| 3                   | 830              | 1       |
| 4                   | 530              | 1       |
| Coeficiente angular | -0,0583          | -0,6458 |

Legenda: Unidade formadora de colônias por grama.

Figura 1 - Variação da concentração de células do lote de item de ensaio de *Salmonella* spp. estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C.



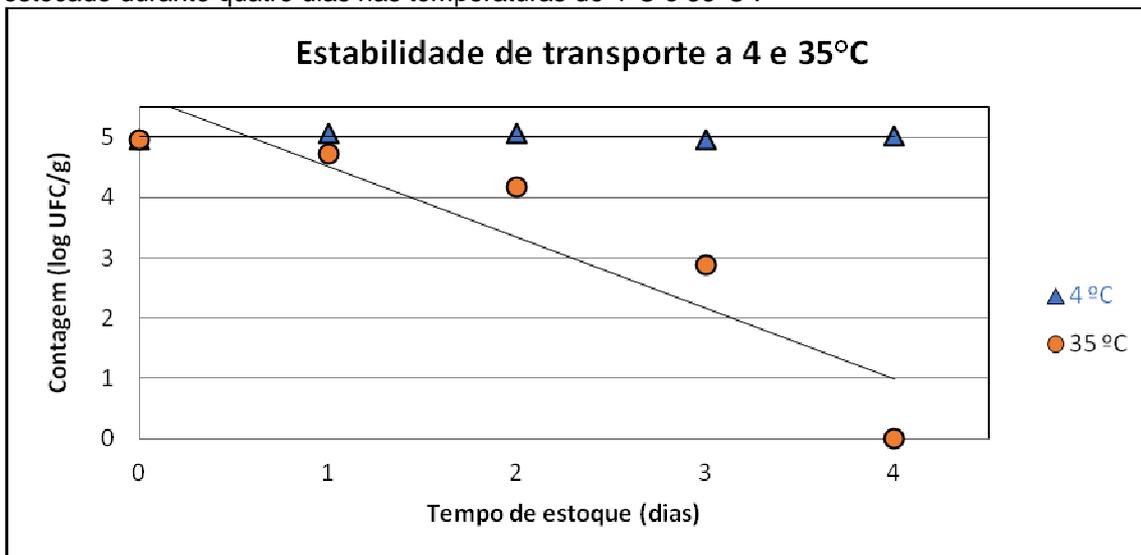
Legenda: log<sub>10</sub> – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônias por grama.

Tabela 8 - Contagem das UFC do estudo de estabilidade em curto prazo (transporte) do lote de item de ensaio *S. aureus* estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C.

| Dias                   | Contagem (UFC/g) |         |
|------------------------|------------------|---------|
|                        | 4 °C             | 35 °C   |
| 0                      | 90750            | 90750   |
| 1                      | 118500           | 53250   |
| 2                      | 114500           | 14750   |
| 3                      | 89750            | 750     |
| 4                      | 106500           | 1       |
| Coeficiente angular    |                  | 0,009   |
| Intervalo de Confiança | Superior         | 0,04788 |
|                        | Inferior         | 0,06624 |
| Erro Padrão            |                  | 0,01793 |

Legenda: UFC/g - Unidade formadora de colônias por grama.

Figura 2 - Variação da concentração de células do lote de item de ensaio de *S. aureus* estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C .



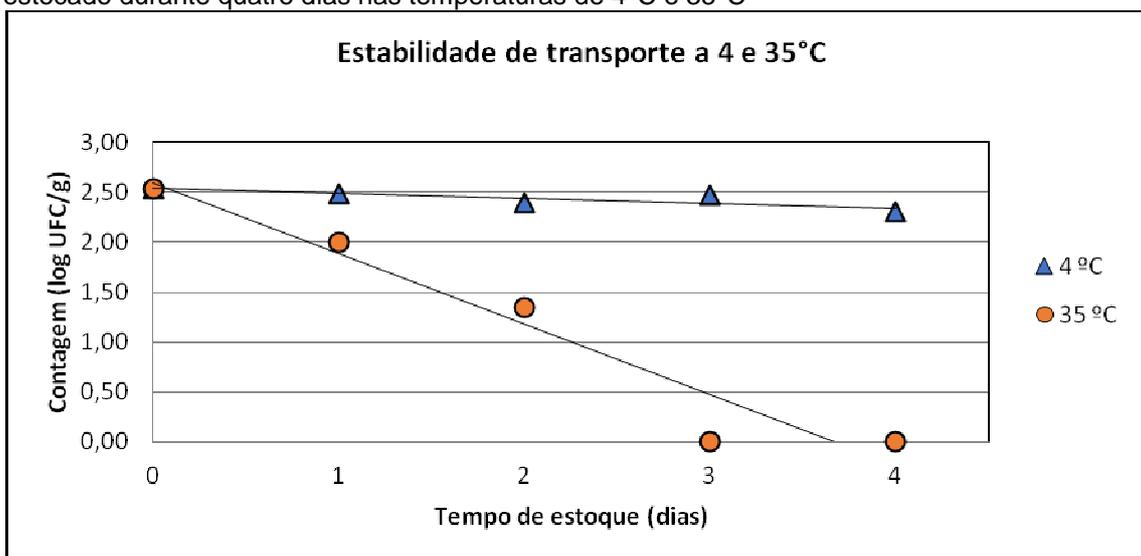
Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônia por grama.

Tabela 9 - Contagem das UFC do estudo de estabilidade em curto prazo (transporte) do lote de item de ensaio de *Escherichia coli* estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C.

| Dias                   |          | Contagem ( $\log_{10}$ UFC/g) |          |
|------------------------|----------|-------------------------------|----------|
|                        |          | 4 °C                          | 35 °C    |
| 0                      |          | 2,54                          | 2,54     |
| 1                      |          | 2,48                          | 2,00     |
| 2                      |          | 2,40                          | 1,35     |
| 3                      |          | 2,48                          | 0,00     |
| 4                      |          | 2,30                          | 0,00     |
| Coeficiente angular    |          | -0,069                        | -0,718   |
| Intervalo de Confiança | Superior | 0,00093                       | -0,39805 |
|                        | Inferior | -0,14048                      | -1,03876 |
| Erro Padrão            |          | 0,02222                       | 0,29158  |

Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônia por grama.

Figura 3 - Variação da concentração de células do lote de item de ensaio de *Escherichia coli* estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C



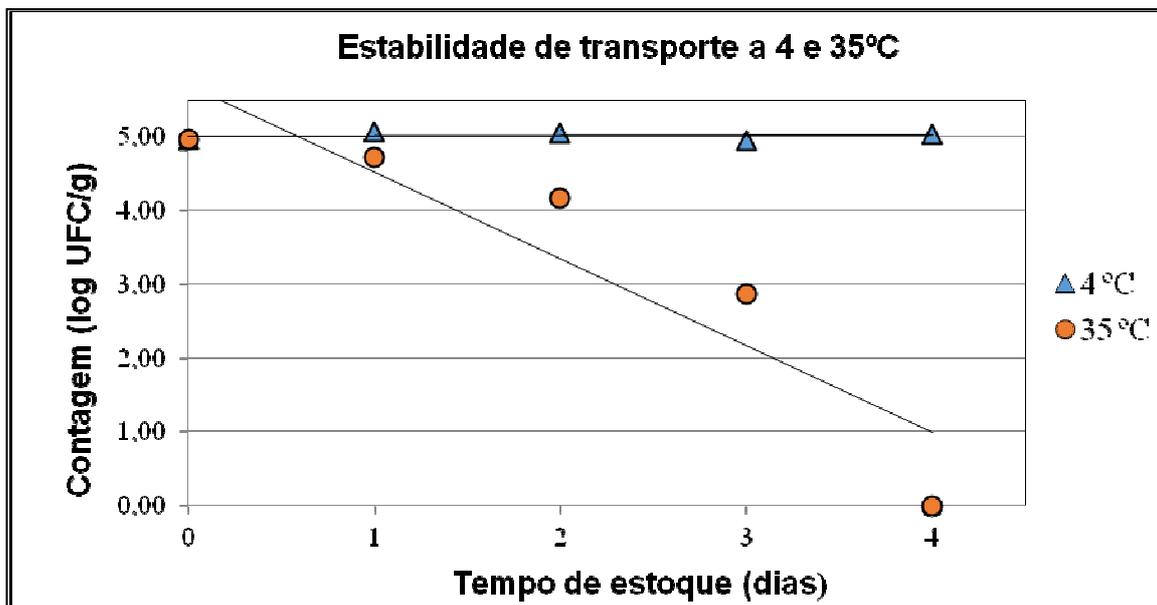
Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônia por grama.

Tabela 10 - Contagem das UFC do estudo de estabilidade em curto prazo (transporte) do lote de item de ensaio de *Citrobacter freundii* estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C.

| Dias                 | Contagem ( $\log_{10}$ UFC/g) |         |
|----------------------|-------------------------------|---------|
|                      | 4 °C                          | 35 °C   |
| 0                    | 4,96                          | 4,96    |
| 1                    | 5,07                          | 4,73    |
| 2                    | 5,06                          | 4,17    |
| 3                    | 4,95                          | 2,88    |
| 4                    | 5,03                          | 0,00    |
| Coefficiente angular | 0,0018                        | -1,1767 |

Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônia por grama.

Figura 4 - Variação da concentração de células do lote de item de ensaio de *Citrobacter freundii* estocado durante quatro dias nas temperaturas de 4°C e 35°C.



Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônia por grama.

De acordo os cálculos estatísticos preconizados na NBR ISO GUIA 35 (ABNT, 2012), os lotes de *S. aureus* e *E. coli* foram considerados suficientemente estáveis a 4 °C, no entanto, não-estáveis a 35 °C.

Os lotes de *C. freundii* e *Salmonella* foram suficientemente estáveis a 4 °C. Por mais que pela análise de regressão linear, os lotes de *C. freundii* e *Salmonella* tenham sido considerados suficientemente estáveis a 35 °C, pela análise visual de tendência das Figuras 1 e 4, é possível observar claramente o decréscimo da concentração celular ao longo dos dias.

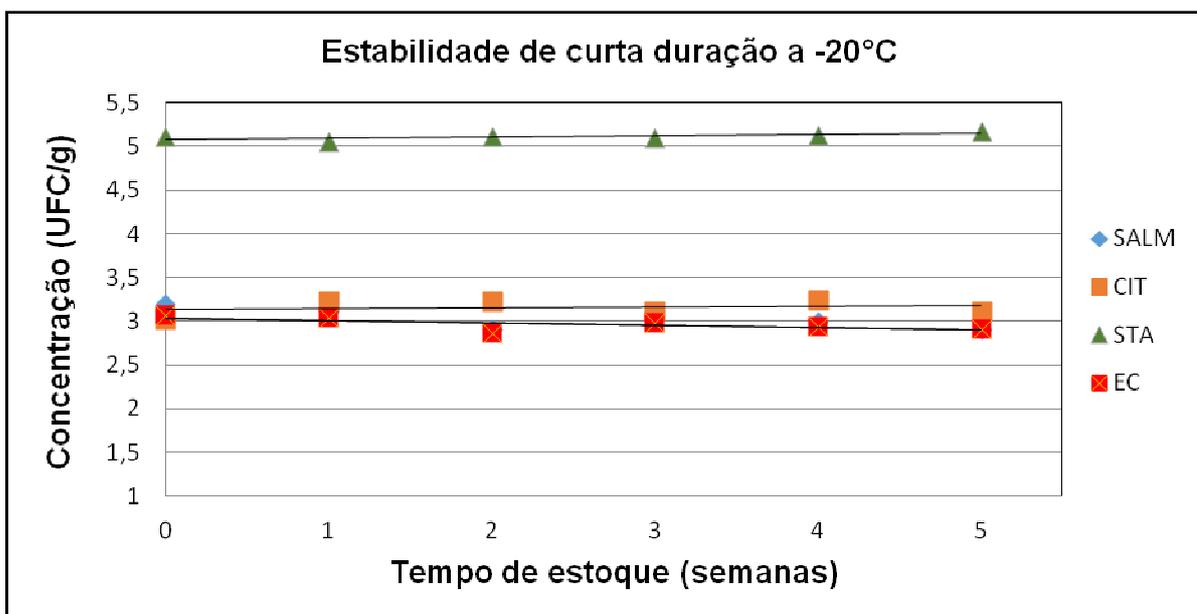
Também foram avaliadas as flutuações nas concentrações de *Salmonella spp*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. freundii* nas temperaturas de referência -70°C e armazenamento -20°C (modelo clássico), conforme as Tabelas 11 e 12, e Figuras 5 e 6.

Tabela 11 - Resultado das contagens do estudo de estabilidade em longa duração durante cinco semanas estocados a -20°C.

| Semanas                |          | Contagem ( $\log_{10}$ UFC/g) |                 |                 |               |
|------------------------|----------|-------------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
|                        |          | SALM                          | STA             | EC              | CIT           |
| 0                      |          | 3,20                          | 5,11            | 3,07            | 3,03          |
| 1                      |          | 3,11                          | 5,06            | 3,04            | 3,23          |
| 2                      |          | 2,92                          | 5,11            | 2,87            | 3,24          |
| 3                      |          | 3,11                          | 5,10            | 2,98            | 3,12          |
| 4                      |          | 3,00                          | 5,13            | 2,94            | 3,24          |
| 5                      |          | 2,91                          | 5,17            | 2,92            | 3,12          |
| Coeficiente angular    |          | <b>-0,0272</b>                | <b>0,0151</b>   | <b>-0,0272</b>  | <b>0,0095</b> |
| Intervalo de Confiança | Superior | -                             | <b>0,00595</b>  | <b>0,00180</b>  | -             |
|                        | Inferior | -                             | <b>-0,00148</b> | <b>-0,01025</b> | -             |
| Erro Padrão            |          | -                             | <b>0,00117</b>  | <b>0,00217</b>  | -             |

Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g - unidade formadora de colônia por grama; SALM – *Salmonella*; STA - *Staphylococcus aureus*; EC – *Escherichia coli* e CIT – *Citrobacter*.

Figura 5 - Variação da concentração de células dos IE estocados a temperatura de -20°C durante cinco semanas



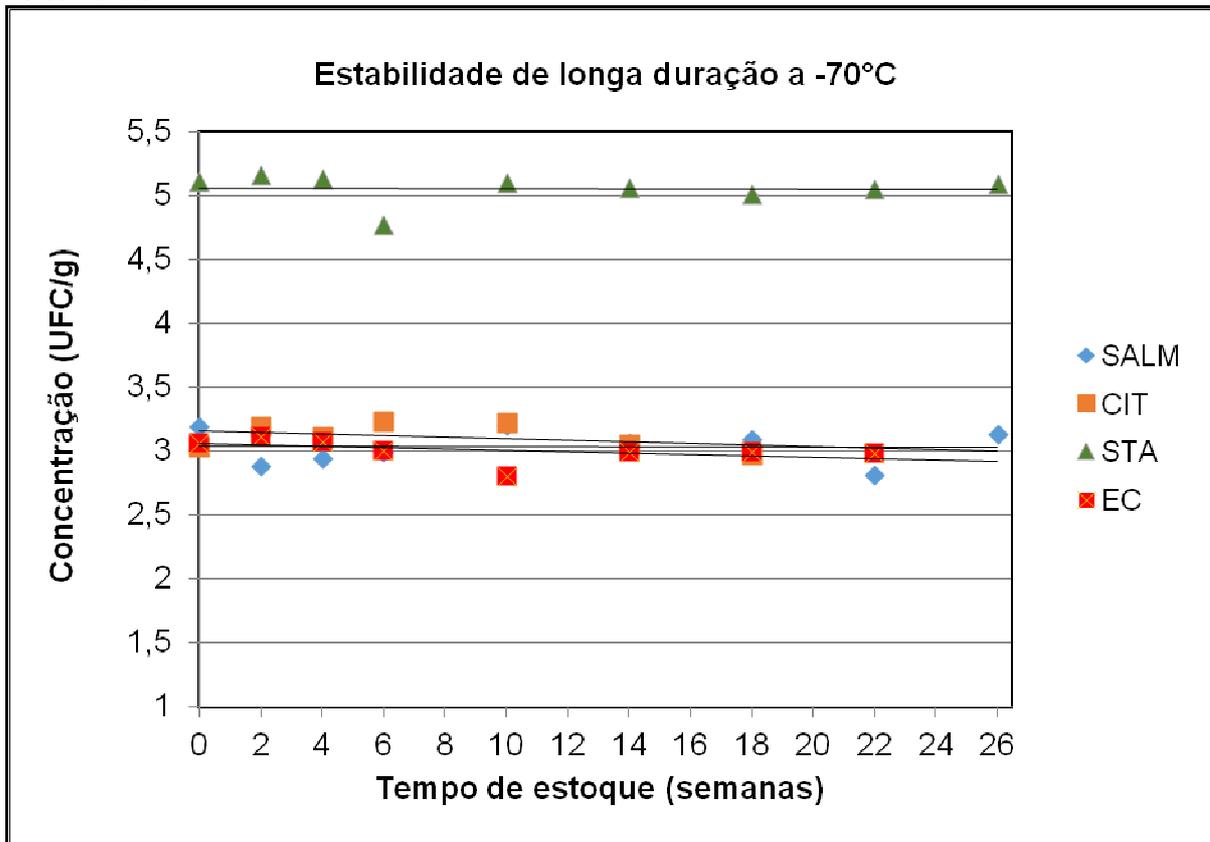
Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônia por grama.

Tabela 12: Contagem das UFC do estudo de estabilidade em longa duração durante 26 semanas estocados a -70°C.

| Semanas                |          | Contagem ( $\log_{10}$ UFC/g) |          |               |               |
|------------------------|----------|-------------------------------|----------|---------------|---------------|
|                        |          | SALM                          | STA      | EC            | CIT           |
| 0                      |          | 3,20                          | 5,11     | 3,07          | 3,03          |
| 2                      |          | 2,89                          | 5,16     | 3,12          | 3,19          |
| 4                      |          | 2,94                          | 5,14     | 3,08          | 3,11          |
| 6                      |          | 2,99                          | 4,77     | 3,00          | 3,23          |
| 10                     |          | 3,21                          | 5,10     | 2,81          | 3,23          |
| 14                     |          | 3,06                          | 5,06     | 2,99          | 3,05          |
| 18                     |          | 3,09                          | 5,02     | 2,99          | 2,97          |
| 22                     |          | 2,81                          | 5,06     | 2,98          | Não Realizado |
| 26                     |          | 3,13                          | 5,09     | Não Realizado | Não Realizado |
| Coeficiente angular    |          | -0,0004                       | -0,0005  | -0,0051       | -0,0061       |
| Intervalo de Confiança | Superior | -                             | 0,00031  | 0,00121       | -             |
|                        | Inferior | -                             | -0,00088 | -0,00339      | -             |
| Erro Padrão            |          | -                             | 0,00025  | 0,00089       | -             |

Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônia por grama; SALM – *Salmonella*; STA - *Staphylococcus aureus*; EC – *Escherichia coli* e CIT – *Citrobacter*.

Figura 6: Variação da concentração de células dos IE estocados a temperatura de -70°C durante 26 semanas



Legenda:  $\log_{10}$  – logaritmo de base 10; UFC/g – unidade formadora de colônia por grama.

Os lotes de *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. freundii* foram considerados suficientemente estáveis a -20°C e -70°C de acordo os cálculos estatísticos preconizados na ABNT ISO GUIA 35 (ABNT, 2012).

## 5 DISCUSSÃO

O chocolate é um tipo de alimento consumido por pessoas de todas as idades, pois além das apreciadas propriedades sensoriais, ele apresenta benefícios potenciais à saúde humana (ABICAB, 2015).

Surtos de salmonelose foram relacionados ao consumo de chocolate, fazendo com que o controle microbiológico desse produto seja de grande importância (REOLON et al, 2012).

No presente trabalho foram realizadas análises microbiológicas nas amostras de chocolate para pesquisa de *Salmonella* spp., enumeração de coliformes a 45°C e estafilococos coagulase positiva, não sendo detectados os micro-organismos nas amostras, evidenciando que podem ser utilizadas como matriz para produção de IE.

Análises microbiológicas em chocolate também foram realizadas por Reolon e colaboradores (2012), que utilizaram amostras de chocolate ao leite, branco, meio amargo e em pó comercializadas no Brasil. Das 65 amostras analisadas, nenhuma apresentou contaminação por coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella*. No entanto, nas amostras de chocolate ao leite e branco, foram detectadas enterobactérias totais em 22,7% e em 11,7%, e coliformes totais em 13,6% e em 4,5% respectivamente. Portanto, as indústrias de chocolate devem manter um rigoroso programa de boas práticas de fabricação para garantir a segurança microbiológica desses produtos.

A contaminação de alimentos pode ocorrer por meio da água, dos recipientes e utensílios contaminados e dos próprios manipuladores (GERMANO; GERMANO, 2000). Brant e colaboradores (2007) explicaram a ausência de *Salmonella* spp. pela menor capacidade de competição desse micro-organismo em relação a outros organismos de maior ocorrência, como os coliformes.

Devido à importância do controle microbiológico, os laboratórios que realizam estas análises devem garantir resultados precisos e confiáveis, pois um resultado falso positivo pode originar uma desnecessária eliminação de um gênero alimentício e impactos financeiros, já um resultado falso negativo pode

originar sérios problemas de saúde pública. Além disso, quantificações microbiológicas não-exatas podem levar a posições competitivas desleais (CUNHA et al, 2015).

Desse modo, é pertinente a implantação de um sistema da qualidade nesses laboratórios a fim de determinar o controle e a rastreabilidade de todas as etapas das análises. Para gerenciamento da qualidade, a importância dos EP e/ou ensaios interlaboratoriais é reconhecida pelas autoridades e pela comunidade científica internacional (CUNHA et al, 2015; ROSAS, 2009). No entanto, existe uma escassez de informações referentes à produção de IE destinados a EP.

Tendo em vista a necessidade desse tipo de informação em Microbiologia de Alimentos, o presente trabalho desenvolveu IE em matriz chocolate para utilização em EP.

Nesse estudo, foi realizada a comparação entre chocolates – granulado, em barra e em pó – para a escolha da matriz. Esses foram observados em condições de pré-liofilização ou não. Como resultado, detectou-se a ausência de crescimento de *Salmonella* spp. e *E. coli* nas amostras de chocolate em pó com e sem pré-liofilização. De acordo com Reolon e colaboradores (2012), o alto teor de gordura propicia o aumento da resistência térmica dos enteropatógenos. Assim, pode-se explicar a ausência de crescimento na amostra de chocolate em pó por esta possuir menor teor de gordura em relação ao chocolate em barra e ao granulado.

A matriz escolhida foi o chocolate granulado não-liofilizado previamente, que apresentou aspecto satisfatório na inspeção visual e suficientemente homogêneo e estável.

Durante o preparo dos IE, foi analisada a concentração das suspensões de micro-organismos para o controle da concentração das células. De acordo com Brandão (2012), o banho de gelo pode ser suficiente para evitar o crescimento bacteriano durante a produção dos IE. Rosas e colaboradores (2010) observaram a viabilidade bacteriana decrescendo na seguinte ordem: bactérias formadoras de esporos, Gram-positivas e Gram-negativas.

A verificação da pureza realizada mostrou-se satisfatória nos quatro lotes analisados, indicando ausência de contaminação por outros micro-organismos nos IE produzidos.

Nesse estudo foi utilizado o método de liofilização para preservação das bactérias. Esse método se destaca para a maioria dos micro-organismos por garantir a identidade original da célula por longos períodos (ROSAS, 2009).

A inspeção de vácuo realizada no presente trabalho exibiu vácuo em 100% dos frascos dos quatro lotes produzidos. Outros trabalhos que utilizaram o método de liofilização também mostraram seus resultados da inspeção de vácuo realizada na produção de IE em Microbiologia de Alimentos, como Costa e colaboradores (2015) que apresentaram vácuo em 96,5% dos frascos produzidos em matriz queijo, Brandão e colaboradores (2013a) em 98,2% na matriz queijo e Brandão e colaboradores (2014) em 94,2% em matriz carne bovina.

A avaliação estatística do teste da homogeneidade foi realizada de acordo com o Protocolo Harmonizado com desvio padrão alvo de 0,25, valor também utilizado pelo *Food Examination Performance Assessment Scheme* (FEPAS), que é provedor de EP de alimentos da Inglaterra, para avaliação da homogeneidade dos IE produzidos (ROSAS et al, 2010). Para os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. freundii*, os IE foram considerados suficientemente homogêneos em matriz chocolate granulado; para o lote referente à *Salmonella* spp., o IE foi considerado não homogêneo para essa matriz, no entanto por se tratar de um ensaio qualitativo, o lote pode ser utilizado desde que todos os frascos analisados tenham a presença do micro-organismo.

Estudos desenvolveram IE para Microbiologia de Alimentos pelo método de liofilização em matriz queijo, produzindo lotes suficientemente homogêneos para pesquisa de *Salmonella* spp. (COSTA et al, 2015) e de estafilococos coagulase positiva (Brandão et al, 2013a).

Brandão e colaboradores (2014) produziram lotes homogêneos para *Salmonella* spp. em matriz carne bovina crua e lotes não homogêneos em matriz carne cozida e enlatada por liofilização.

Em matriz leite, Rosas e colaboradores (2010) produziram lotes suficientemente homogêneos ( $\sigma_p$  de 0,10 e 0,27) para *Salmonella* spp. por

liofilização, e Schulten e colaboradores (2000) produziram lote homogêneo para *Salmonella* Typhimurium em cápsulas de leite em pó por *spray-dryer*

O estudo da estabilidade de transporte (em curto prazo) foi realizado de acordo com a ABNT ISO GUIA 35 (ABNT, 2012), tendo como resultado que os lotes de *Salmonella* spp. e *C. freundii* foram considerados estáveis a 4 °C e a 35 °C, já os lotes de *S. aureus* e *E. coli* foram considerados estáveis a 4 °C, no entanto, não-estáveis a 35 °C. Apesar de alguns lotes serem classificados como estáveis a 35 °C, o número de células foi decrescendo ao longo dos dias, indicando que a permanência por mais tempo nessa temperatura poderia comprometer a concentração de células.

A estabilidade de transporte dos IE desses micro-organismos também foi avaliada segundo a ABNT ISO GUIA 35 (ABNT, 2012) em outros estudos (COSTA et al, 2015; BRANDÃO et al, 2013a-c, 2014; ROSAS et al, 2010).

Em matriz queijo, Costa e colaboradores (2015) avaliaram um lote de IE para *Salmonella* spp., durante seis dias, identificando que esse foi estável a 4 °C e 35 °C. Também na matriz queijo, Brandão e colaboradores (2013b) estudaram em seis dias a estabilidade dos lotes de IE produzidos para coliformes, verificando que esses foram suficientemente estáveis a 4 °C, 25 °C e 35 °C. Lotes de IE produzidos para EP foram avaliados por Brandão e colaboradores (2013a) em seis dias de estudo a 4 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C, e verificaram que os lotes apresentavam estabilidade durante quatro dias.

Na matriz carne bovina, Brandão e colaboradores (2014) realizaram um estudo de três dias, obtendo lotes de *Salmonella* spp. estáveis a 4 °C e 35 °C.

Em matriz leite, foi realizado por Rosas e colaboradores (2010) um estudo de estabilidade de transporte durante seis dias, considerando os lotes de IE para *Salmonella* spp. e *C. freundii* estáveis a 4 °C. No entanto esses lotes não foram estáveis nas temperaturas de 25 °C e 37 °C devido a uma diminuição expressiva na concentração bacteriana já no segundo dia do estudo da estabilidade de transporte.

O estudo da estabilidade em longa duração também foi realizado seguindo a ABNT ISO GUIA 35 (ABNT, 2012), de modo que foram considerados estáveis a -20 °C todos os micro-organismos estudados. Nota-se que esses micro-organismos são bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, contudo, isso

não implicou em declínios na concentração de células ao longo do tempo, provavelmente devido ao uso dos crioprotetores.

Costa e colaboradores (2015) avaliaram a estabilidade em longa duração de um lote de IE para *Salmonella* spp., identificando que este apresentou estabilidade durante os 168 dias de estudo.

Lotes de IE produzidos para *Salmonella* spp. e *S. aureus* também tiveram sua estabilidade em longo prazo estudada por Rosas e colaboradores (2010) que verificaram que esses se mantiveram estáveis quando estocados por até 3 meses a -20 °C.

Outros estudos, como os de In't Veld e colaboradores (1999) e Philipp e colaboradores (2007), demonstraram que os IE produzidos por *spray dryer* também possuem estabilidade por longos períodos a temperaturas -20 °C.

No presente estudo foi realizado o estudo da estabilidade em longa duração seguindo a ABNT ISO GUIA 35 (ABNT, 2012), sendo suficientemente estáveis a -70 °C por seis meses todos os lotes de IE produzidos. Os estudos de Costa e colaboradores (2015) e Brandão e colaboradores (2013a-c, 2014) também produziram lotes suficientemente estáveis.

É importante a obtenção de IE suficientemente estáveis em longa duração a temperaturas superiores a -70 °C pois nem todos os laboratórios podem estocar o IE nessa temperatura de referência (BRANDÃO, 2012).

O presente estudo utilizou trealose e sacarose como crioprotetores visando proporcionar maior estabilidade dos micro-organismos na matriz. Essas moléculas de açúcar podem substituir moléculas de água presentes dentro das células, que hidratam suas proteínas e membranas, e previnem a desnaturação das proteínas (BRANDÃO et al, 2013d). Foi verificado por Leslie e colaboradores (1995), o aumento da estabilidade das membranas das células liofilizadas de *E. coli* com a adição de trealose e sacarose. Em bactérias Gram-negativas liofilizadas, Wessman e colaboradores (2011) verificaram melhor viabilidade destas utilizando a sacarose a 10% (p/v).

## 6 CONCLUSÕES

- As amostras de chocolate em barra, granulado e em pó não apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., estafilococos coagulase positiva e coliformes a 45 °C;
- O processo de pré-liofilização nos lotes piloto em matriz chocolate em barra, granulado e em pó não resultou em diferenças significativas no número de células dos micro-organismos;
- A comparação entre os lotes piloto em matriz chocolate em pó, barra e granulado, determinou a escolha do chocolate granulado pelo seu melhor aspecto e homogeneidade;
- A técnica de liofilização se mostrou eficaz para dessecação dos IE produzidos em matriz chocolate, apresentando resultados satisfatórios no controle do vácuo;
- O uso de sacarose e trealose no preparo dos lotes se mostrou adequado como crioprotetores dos IE produzidos por liofilização;
- Os IE produzidos nesse estudo para enumeração de estafilococos coagulase positiva e coliformes a 45°C em matriz chocolate apresentaram resultados suficientemente homogêneos. Já o lote de IE para pesquisa de *Salmonella* spp. em matriz chocolate não se apresentou suficientemente homogêneo;
- Os lotes de *Salmonella* spp e *C. freundii* foram considerados estáveis a 4 °C e 35 °C por 4 dias, já os lotes de *S. aureus* e *E. coli* foram considerados estáveis a 4 °C, no entanto, não-estáveis a 35 °C pelo decréscimo sofrido na concentração celular.
- Todos os lotes produzidos se apresentaram estáveis durante cinco semanas, à temperatura de -20 °C e durante 26 semanas a -70°C;
- Os lotes de IE em matriz chocolate granulado produzidos nesse estudo apresentaram qualidade que os tornam aptos para uso em EP, contribuindo com o gerenciamento da qualidade no controle microbiológico do chocolate.

## REFERÊNCIAS

ABICAB - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATES, CACAU, AMENDOIM, BALAS E DERIVADOS, 2013. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br/>>. Acesso em: 4 de maio de 2015.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO GUIA 35: Materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025. *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. ISO 17025*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17043. *Avaliação de conformidade - Requisitos gerais para ensaios de proficiência. ISO 17043*. Rio de Janeiro: ABNT, 2011.

ANVISA. Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Agencia/Publicacao+Agencia/A+Anvisa+e+o+Sistema+Nacional+de+Vigilancia+Sanitaria1>. Acesso em: 20 de agosto de 2015.

ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Sci. agric.*, vol. 54, n. 3, 1997.

ARUNACHALAM, J.; BLEISE, A.; MAHWAR, R.S.; RAMADEVI, P.; IYENGAR, G.V. The natural matrix reference material database of the International Atomic Energy Agency: Reference materials in support of dietary investigations. *Journal of Food Analysis*, v.19, p. 241-249, 2006.

BATISTA, A. P. S. A. Chocolate: sua história e principais características. 2008. 56 f. Monografia (Especialização em Gastronomia e Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BECKETT, Stephen T. La ciencia del Chocolate. Tradução: Antonio Vercet Tormo. Zaragoza: Acribia, 2002.

BOANOVA, A. B. Análises e interpretação de denúncias sobre alimentos como ferramenta de gestão, no município de São Paulo. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública – USP, São Paulo, 2014.

BRANCO, N. M. C. Avaliação da utilização do sistema notivisa pelo INCQS e pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública no ano de 2008. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2010.

BRANDÃO, M. L. L. Produção de material de referência em matriz queijo para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. 2012. 54p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

BRANDÃO, M. L. L.; COSTA, J. C. B.; FARIAS, F. M.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M.; NASCIMENTO, J. S.; CARDARELLI-LEITE, P. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. *Braz. J. of Food Technol.*, v. 16, n. 1, p. 73-79, 2013a.

BRANDAO, M. L. L.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; MEDEIROS, V. M.; COSTA, J. C. B.; PINHEIRO, R. R.; CARDARELLI-LEITE, P.; DE LA CRUZ, M. H. C.; NOBREGA, A. W. Preparation of reference material for proficienc test for enumeration of coliforms in cheese matrix. *Detection*, n.1, p.7-12, 2013b.

BRANDAO, M. L. L.; COSTA, J. C. B.; FARIAS, F. M.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; NASCIMENTO, J. S. CARDARELLI-LEITE, P. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo *Listeria monocytogenes* em matriz queijo. *Ciência Rural*, v.43, n.10, p.1905-1910, 2013c.

BRANDAO, M. L. L.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; COSTA, J. C. B.; MEDEIROS, V. M.; WARNKEN, M. B.; CRUZ, M. H. C. L.; NOBREGA, A. W. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v.72, n.2, p.144-150, 2013d.

BRANDAO, M. L. L.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; COSTA, J. C. B.; VIEIRA, L. R.; MEDEIROS, V. M.; WARNKEN, M. B. Avaliação de Matrizes de Carne Bovina na Produção de Itens de Ensaio de Proficiência para Pesquisa de *Salmonella* spp. *Alim.Nutr.=Braz.J.Food Nutr.*, v. 25, n.1, p.13-18, 2014.  
BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M., SILVA, M .C. C.; Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro - MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.6, p.1570-1574, Brasil, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portal da ANVISA. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia!/ut/p/c4/04\\_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B\\_A3cPQ\\_2CbEdFALjii\\_4!/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/anvisa+portal/anvisa/agencia/publicacao+agencia/vigilancia-sanitaria-no-brasil](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B_A3cPQ_2CbEdFALjii_4!/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/anvisa+portal/anvisa/agencia/publicacao+agencia/vigilancia-sanitaria-no-brasil)>. Acesso em: 17 de abril de 2014.

BRASIL. Presidência da República. Constituição da República Federativa do Brasil de 5 de outubro 1998. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 out. 1988.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990. Regula em todo o território nacional, as ações e serviços de saúde, executados isolados ou conjuntamente, em caráter permanente ou eventual, por pessoas naturais ou jurídicas de direito público ou privado. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n.7-E, p.45, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº343, de 19 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a obtenção, testagem, processamento e Controle da Qualidade de Sangue e Hemocomponentes para uso humano.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº302, de 13 de outubro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 de outubro, 2005.

CABOCLO, R. M. F. *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isolados de hospitais do rio de janeiro: aspectos fenotípicos e moleculares da resistência e correlação com virulência e genótipos. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

CARDOSO, M. H. W. M. Preparação de um Material de Referência Certificado para Controle de Agrotóxicos em Hortifrutigranjeiros. 2008, 191 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

CARNEIRO, Henrique. *Comida e Sociedade: uma história da alimentação*. Rio de Janeiro: Elsevier, 5ª ed 2003.

CARVALHO, I. T. *Microbiologia dos Alimentos*. E- Tec, UFRPE/CODAI p, 19-80. 2010.

CAVA. A. J; SILVA. C. A. B; FRAS. J. R. G. *Tecnologia de Alimentos: princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel, 2009.

CEPLAC. Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira. Disponível em: <[http://www.ceplac.gov.br/radar/radar\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm)>. Acesso em: 01 de setembro 2015.

CODEX ALIMENTARIUS - STANDARD FOR CHOCOLATE AND CHOCOLATE PRODUCTS 87-1981, Rev. 1, 2003. Disponível em: [http://codexalimentarius.net/standardschocolate/Downloads/CXS\\_087e.pdf](http://codexalimentarius.net/standardschocolate/Downloads/CXS_087e.pdf). Acesso em: 14 de abril de 2014.

COLLA, E. Seleção de leveduras produtoras de trealose e otimização da produção utilizando estratégias sequenciais de planejamento experimental. 2008. 116 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, Campinas, 2008.

CORDEIRO, M. Caracterização molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas no Hospital Municipal de Ipatinga-MA. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG, 2011.

CORDIER, J. L. HACCP in the chocolate industry. *Food Control* 5:171-175. 1994.

COSTA, J. C. B.; BRANDAO, M. L. L.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; MEDEIROS, V. M.; CRUZ, M. H. C. L.; NOBREGA, A. W. Pinheiro R. R.; Machado, M. A. A. Preparo de Itens de Ensaio de Proficiência em Matriz Queijo para a Pesquisa de Salmonella spp. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, 2015.

CUNHA, I.C.; CORREIA, C.B.; SARAIVA, M.; PENA, C.; FARIA, A.P.; CALHAU, M.A. Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade em Microbiologia de Alimentos: 13 anos de ensaios interlaboratoriais. *Instituto Nacional de Saúde*. n12, 2015.

D'AOUST, J.Y.; MAUER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. *Food Microbiology: fundamental and frontiers*, 3. ed. Cap. 10. Washington, DC: ASM Press, 2007, 1038p.

DONOVAN, J. Diversification in International Cacao Markets: opportunities and challenges for smallholder cacao enterprises in Central America. A consultancy report prepare for RUTA. Turrialba, Costa Rica: Catie, p. 35, 2006.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food, in 2011. EFSA Journal, v.11, n.5, 2013.

EPTIS - [https://www.eptis.bam.de/en/pt\\_providers/](https://www.eptis.bam.de/en/pt_providers/). Acesso em: 07 de setembro de 2015.

EUROPEAN COMMISSION. *Salmonella in Foodstuffs*. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health, 2003. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf). Acesso em: 30 de outubro de 2015.

FEITOSA, T.; BRUNO, L.M.; BORGES, M.F. Segurança Microbiológica dos Alimentos. In: BASTOS, M.S.R. (Org.). Ferramentas da ciência e tecnologia para a segurança dos alimentos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical: Banco Nordeste do Brasil, 2008. Cap.1. p. 21-39.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. 1ed- Porto Alegre: Artemd, 2002.

FRANCO, B. D. G.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; GELLI, D. S. Foodborne Disease in Southern South América. FDA, 2002.

FSAI. Food Safety Authority of Ireland. *Salmonella* species. v.1. set.2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 4. ed. Barueri: Manole, 2011.

GÓMEZ-JUARISTI, M. GONZÁLEZ-TORRES, L. VAQUERO M. P.B.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutr. Hosp.* v.26, n.2, Madrid, 2011.

GUIBOURDENCHE, M. ROGGENTIN, P. MIKOLEIT, M. FIELDS, I. BOCKEMU, J. GRIMONT, A.D. FRANC, OIS-XAVIER WEIL. Supplement 2003e2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Elsevier*. Paris, 2010.

HARKER, S. K.; LANE, C; GORMLEY, F. J; ADAK, G. K. National outbreaks of *Salmonella* infection in the UK, 2000-2011. *Epidemiol. Infect.* 2014, v. 142, n.3, p. 601-7. London, 2013.

HENNEKINE, J. A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A. L.; DRSGSCCI, S. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. *Toxins*, v.1, n.8, p.2106-2116, 2010.

HUBÁLEK, Z. Protectans used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol.* v.46, n.3, p.205-229, 2003.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA <https://www.inmetro.gov.br/credenciamento/>. Acesso em: 18 de abril de 2015.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 13528: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*. Switzerland, 2005.

IN'T Veld, P.H.; Havelaar, A.H.; Van Strijp-Lockfeer, N.G.W.M. The certification of a reference material for the evaluation of methods for the enumeration of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.86, p.266-274, 1999.

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

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology*, v.61, p.3592-3597, 1995. LPSN - *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. <<http://www.bacterio.net/>> Acesso em: 19 de Setembro 2014.

LUCCHESI, G. Globalização e Regulação Sanitária: os Rumos da Vigilância Sanitária no Brasil. 2001.326 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo CRUZ, Rio de Janeiro, 2001.

MARTINS, P. Análise da distribuição das espécies, da prevalência de genes de enterotoxinas e do perfil de resistência a antibióticos de isolados de *Estafilococos* coagulase positiva isolados de carne de frango resfriada e congelada. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Descrição da doença. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/11216-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 08 de outubro de 2015.

NASCIMENTO, M.G.F.N; CORBIA, A.C.G; NASCIMENTO, E.R. Limitações da Técnica de Isolamento e Enumeração de *Staphylococcus aureus*. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos. Embrapa CTAA. Comunicado Técnico,45. ISSN 0103-5231, p. 4, 2001.

OLIVEIRA, C. A.; MENDES, M. E. Gestão da Fase Analítica do Laboratório. 1ed, p.47-97. Rio de Janeiro, 2011.

PENHA, E.M., MATA, V.M. Características físico-químicas e microbiológicas da polpa de cacau. Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, n.33, v.11, p. 1945-1949, 1999.

PEREIRA, P. R. G. Relação da qualidade do cacau ao mercado atual e no mundo. Ilhéus, BA, CEPEC, 2009.

PHILIPP, W. J.; IWAARDEN, P. V.; SCHIMMEL, H.; MEEUS, N.; KOLLMORGEN, N. Development of reference materials for microbiological analysis. Accreditation and Quality Assurance, v.12, n.3-4, p.134-138, 2007.

PLEBANI, M., SANZARI, M. C., ZARDO, L. Quality control in coagulation testing. Semin Thromb Hemost, v.34, n.7, p.642, 2008.

REOLON, E.M., SANTOS A.R.B., MOREIRA V.E., NASCIMENTO M.S. Pesquisa de enterobactérias em chocolates. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, n.71, v.1, p.40-43, 2012.

REZENDE, A.C.B. Incidência de *Salmonella* spp. em caqui (*Diospyrus kaki*) e crescimento de *S. Enteritidis* na casca e na polpa dessa fruta. 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, Piracicaba, 2007.

RICHTER, M., LANNES, S. C. S. Bombom para dietas especiais: avaliação química e sensorial. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*, Campinas, v.27, n.1, p. 193-200, 2007.

ROSAS, C. O. Produção de Materiais de Referência para Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2009.

ROSAS, C. O, Brandao MLL, Bricio SML, Medeiros VM, Bernardo SPC, De La Cruz MHC et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):15-22.

SALES, W. B.; TUNALA, J. F.; VASCO, J. F. M.; RAVAZZANI, E. D. A.; CAVEIÃO, C. Ocorrência de Coliformes Totais e Termotolerantes em pastéis fritos vendidos em bares no centro de Curitiba-PR. *Demetra: alimentação, nutrição & saúde*, v.10, n.1, p. 77-85, 2015.

SALVADOR, I. Atividade Antioxidante e Teor de Resveratrol em cacau, chocolates, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatada. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) - CENA/USP, Piracicaba, 2011.

SILVA, I. F. Enterobactérias na cadeia produtiva do cacau ao chocolate. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4 ed. p. 133-287. São Paulo, 2010.

SCHULTEN, S. M.; IN'T VELD, P.H.; GHAMESHLOU, Z.; SCHIMMEL, H.; LINSINGER, T. The Certification of the Number of Colony Forming Particles of *Salmonella typhimurium* and Number Fraction of Negative Capsules from Artificially Contaminated Milk Powder: CRM 507R. Belgium: European Commission, 2000. 74p. ISBN 92-828-991-8.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. *International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical chemistry laboratories*. Pure Appl. Chem. V. 78(1), p. 145-196, 2006.

VALENZUELA, A.B. El chocolate, un placer saludable. *Revista Chilena de Nutricion*. Santiago, v. 34, n. 3, sep. 2007.

VENÂNCIO, L. F. Avaliação da participação nos estudos interlaboratoriais do setor de medicamentos do INQCS, utilizando os resultados obtidos no período de 2002 a 2009. 2011. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária) - INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2011.

VENELONOV, T.; SAHUQUILLO, A. Optimizing the uses and the costs of reference materials in analytical laboratories. *Trends in Analytical Chemistry*, v.25, n. 5, p.528-533, 2006.

WELSH, D. T.; HERBERT, R. A. Osmotically Induced Intracellular Trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters*. v.174, p.57-63, 1999.

WERBER, D. DREESMAN, J. FEIL, F. ETHELBER, S. International outbreak of Salmonella Oranienburg due to German chocolate. *Biomed Central Infectious Diseases*. n.5, v.7, p. 1-10, Alemanha, 2005.

WESSMAN, P.; MAHLIN, D.; AKHTAR, S.; RUBINO, S.; LEIFER, K.; KESSLER, V.; HAKANSSON, S. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. *Journal of Scientific Food Agricultural*, v.91, p.2518-2528, 2011.

WHO/FAO. World Health Organization / Food and Agriculture Organization. Risk assessment of *Salmonella* in eggs and broiler chickens: interpretative summary. Microbiological risk assessment series, n. 1, 2002.

WHO. World Health Organization. Microbiological risks. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/microbiological-risks/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/microbiological-risks/en/)>. Acesso em: 08 de outubro de 2015.

WINKEL, T. Ecuador and Cacao: An old Alliance. Colorado State University, Department of Horticulture and Landscape Architecture, *College of Agricultural Sciences*, 2013.