



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



Leonardo Hummel de Sousa

Relatório de Estágio Supervisionado

“Treinamento Técnico em laboratório de análises microbiológicas de alimentos”

São José do Rio Preto

2021

LEONARDO HUMMEL DE SOUSA

Relatório de Estágio Supervisionado

“Treinamento Técnico em laboratório de análises microbiológicas de alimentos”

Relatório apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de São José do Rio Preto.

Aluno estagiário: Leonardo Hummel de Sousa

Orientador: Renato Mariano

Supervisora: Profa. Dra. Patrícia Simone Leite
Vilamaior

São José do Rio Preto

2021

S725t

Sousa, Leonardo Hummel De

Treinamento Técnico em laboratório de análises microbiológicas de alimentos / Leonardo Hummel De Sousa. -- São José do Rio Preto, 2021

23 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Renato Mariano

Coorientadora: Patricia Simone Leite Vilamaior

1. Microbiologia de Alimentos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

LEONARDO HUMMEL DE SOUSA

Relatório de Estágio Supervisionado
“Treinamento Técnico em laboratório de análises microbiológicas de alimentos”

Relatório apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de São José do Rio Preto.

Examinador: Nelson César Chopes

São José do Rio Preto
21 de dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente à minha família, por todo o apoio e suporte, que ajudaram a me guiar em minhas escolhas. De cada um de vocês levo preciosas lições, conselhos e ensinamentos. Toda essa bagagem familiar me possibilitou uma formação pessoal e profissional da qual me orgulho e não me arrependo.

À minha companheira, que compartilhou os melhores e piores momentos da minha graduação e que espero acompanhar por toda a vida, Amanda. Muito obrigado por todo o apoio. Você foi e é uma luz nos meus dias. Te amo muito!

Aos meus amigos que me acompanharam em toda essa jornada: sou imensamente grato por ter conhecido vocês durante a graduação e espero que tenham muito sucesso onde quer que o destino os leve. Me sinto imensamente feliz por carregar vocês em minha memória, e faço questão de tê-los comigo nas próximas fases que a vida trouxer.

À minha supervisora, Patrícia, que me acompanhou em tantas atividades nesta graduação: agradeço por todos os conselhos e tempo dedicado para que eu tirasse o maior proveito dos trabalhos realizados sob sua orientação, mesmo durante uma pandemia.

A Priscila, coordenadora do laboratório de microbiologia de alimentos: por ter aceitado o desafio de guiar o novo estagiário com o TCC dele, em que compartilhou anos de conhecimento na área e me ajudando no que fosse nas atividades desempenhadas em laboratório. Muito obrigado!

Ao time do laboratório de microbiologia de alimentos: agradeço o acolhimento, os conselhos, as boas conversas e a ajuda nos diversos desafios em que passamos. Durante todo o estágio, nunca me senti sozinho dentro daquele laboratório. Vocês são feras demais!

À toda equipe da empresa, agradeço muito pelo respeito e carinho. Espero que tenham muito sucesso na carreira de vocês e que atinjam seus objetivos profissionais e pessoais.

A todos que de alguma forma participaram dessa aventura, meu mais que muitíssimo obrigado!

RESUMO

DE SOUSA, L. H. **Relatório de Estágio Supervisionado “Treinamento Técnico em laboratório de análises microbiológicas de alimentos”**, 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2021.

Reconhecida pelo Conselho Federal de Biologia, o biólogo pode trabalhar na indústria de alimentos relacionados com a produção, pesquisa, desenvolvimento e qualidade de alimentos (CFBio, 2019). Relacionado à área de microbiologia de alimentos, é regido por lei que alimentos de qualquer natureza devem passar por uma análise de qualidade, com o objetivo de saber o grau de contaminação microbiológica deste. No Brasil, existem normatizações que dispõem especificamente sobre o assunto, exigindo comprometimento de indústrias e laboratórios para assegurarem que o consumidor final tenha um alimento que não ofereça riscos à saúde dele. A partir de uma série de normas e padronizações, o laboratório de microbiologia de alimentos necessita de acompanhamento diário para que tudo ocorra de forma zelosa, necessitando de boa comunicação, atenção aos detalhes e boa gestão de tempo. Diante do presente contexto, foi realizado um estágio de treinamento em um laboratório de microbiologia de alimentos particular, onde foram trabalhados conteúdos teóricos vistos no curso de graduação e aprimoramento profissional na área em questão. O estágio tratou sobre a manutenção do laboratório, checagem de equipamentos e ambiente, preparo de meio de cultura e manejo de resíduos comum e infectante.

Palavras-chave: microbiologia de alimentos, laboratório de microbiologia, alimentos, manutenção, meio de cultura, resíduos.

ABSTRACT

DE SOUSA, L. H. **Supervised Practice Report “Technical training in the laboratory of microbiological analysis of food”**, 2021. Course Conclusion Work (Graduate in Biological Sciences), São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, 2021.

Accredited by the Federal Council of Biology, the biologists can work in the food industry related to the production, research, development, and quality of food (CFBio, 2019). Related to food microbiology area, it is governed by law that food of any kind must undergo a quality analysis, in order to know the degree of microbiological contamination. In Brazil, there are regulations that specifically provide for the subject, requiring the commitment of industries and laboratories to ensure that the final consumer has food that doesn't pose a risk to his health. Based on a series of rules and standards, the food microbiology laboratory needs daily monitoring so that everything happens in a zealous way, requiring good communication, attention to detail and time management. At this context, a training internship was carried out in a private food microbiology laboratory, where theoretical contents studied in the undergraduate and professional development course were worked on. The internship worked on laboratory maintenance, checking equipment, and the environment, preparing the culture medium and handling common and infectious waste.

Keywords: food microbiology, microbiology laboratory, food, maintenance, culture medium, waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura I - Fluxo Horizontal. Fonte: Arquivo Pessoal.....	3
Figura II - Destilador simples, Balança de precisão e Barriletes. Fonte: Arquivo pessoal.....	4
Figura III - Banho-maria e PHmetro. Fonte: Arquivo Pessoal	5
Figura IV - Termômetro Digital. Fonte: Arquivo Pessoal	7
Figura V - Frasco de Reagente Graduado. Fonte: Arquivo Pessoal.....	10
Figura VI - Erlenmeyer com PCA difundido. Fonte: Arquivo Pessoal	11
Figura VII - Placa de Petri com PCA solidificado. Fonte: Arquivo Pessoal	12
Figura VIII - Erlenmeyer com MYP difundido. Fonte: Arquivo Pessoal	13
Figura IX - Placa de Petri com MYP solidificado. Fonte: Arquivo Pessoal.....	14
Figura X - Tubos contendo Lauril Sulfato com durham. Fonte: Arquivo Pessoal.....	15
Figura XI - Autoclave. Fonte: Arquivo Pessoal.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Relação de intervalos aceitáveis, segundo as normas internacionais	6
--	----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	2
3. DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO	2
4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	5
4.1. REGISTRO DE TEMPERATURA	5
4.1.1. TEMPERATURA X AMBIENTE	6
4.2. PREPARO DE MEIO DE CULTURA	7
4.2.1. MEIO DE CULTURA	8
4.2.2. DO PREPARO	9
4.2.3. PRINCIPAIS MEIOS PREPARADOS E FUNÇÕES	10
4.2.3.1. ÁGUA PEPTONADA TAMPONADA (APT)	10
4.2.3.2 PLATE COUNT AGAR (PCA)	11
4.2.3.3 ÁGAR MANITOL GEMA DE OVO POLIMIXINA (MYP)	13
4.2.3.4 CALDO LAURIL SULFATO	14
4.3 BIOSSEGURANÇA, DESCONTAMINAÇÃO E ESTERILIZAÇÃO.....	15
4.3.1 BIOSSEGURANÇA.....	16
4.3.2 LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO	17
4.3.3 LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DE EQUIPAMENTOS	17
4.3.4 MANEJO DE RESÍDUOS INFECTANTES.....	19
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÕES.....	21
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos ao longo da história exerceram papéis que influenciaram o modo de vida em sociedade. Em períodos anteriores, não se sabia ainda da exata existência de seres microscópicos, mas através de tentativa e erro foi possível desenvolver técnicas que evitassem a proliferação desses, evitando a degradação de elementos vitais para a vida humana, por exemplo, os alimentos (FORSYTHE, 2013). Na atualidade, são reconhecidas milhares de espécies desses microrganismos que possuem papel fundamental na ecologia, na evolução, nas mercadorias e na saúde pública.

Diante de tamanha importância, há diversas bactérias e fungos que são de interesse da indústria de alimentos por possuírem a capacidade de interferir na integridade do alimento, seja como um benefício ou como um malefício. Dessa forma, cabe a essa área produzir ou monitorar a qualidade de um determinado alimento, antes que esse chegue à mesa do consumidor final.

No Brasil a microbiologia de alimentos está muito relacionada à segurança alimentar, sendo do interesse de alguns órgãos federais para que possam ser executadas boas práticas de fabricação e de laboratório, garantindo que a produção seja feita da forma mais higiênica e sanitária possível. Nesse contexto, em todo o país, há os mais diversos laboratórios de microbiologia voltados exclusivamente para a área de alimentos. Tais laboratórios privados garantem a análise de qualidade dos alimentos, enquanto cabe aos órgãos federais estipular os padrões microbiológicos para os lotes de alimentos e assegurar que tais laboratórios estejam de acordo com as normas técnicas nacionais e internacionais.

Os padrões microbiológicos foram publicados no Diário Oficial da União, a partir das Resoluções escritas e discutidas pela Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e podem ser facilmente consultados por qualquer cidadão que assim desejar. Além desses padrões que competem principalmente os resultados das análises realizadas diariamente, o laboratório deve estar em conformidade com as normas nacionais e internacionais para garantir a confiabilidade nos resultados dos ensaios, boa gerência, manutenção e produção no laboratório.

Tais normas, ISO e ABNT, abrangem diversas situações encontradas em laboratório, contando com procedimentos, orientações e recomendações para o bom funcionamento desse. Os órgãos Federais e privados (composto principalmente pelos próprios clientes que contratam o laboratório), reconhecem essas normas como boas práticas e ideais para o recolhimento de resultados confiáveis das amostras ingressadas. O laboratório de microbiologia ainda pode

contar também com recomendações de órgãos localizados no exterior, mas que recebem credibilidade internacional, por exemplo: o *Food and Drugs Administration* (FDA), a agência federal do Departamento de Saúde estadunidense.

Por fim, o laboratório de microbiologia de alimentos também possui consideração especial no resíduo gerado. A partir de métricas estabelecidas pelo Ministério da Saúde e CONAMA publicadas no Diário Oficial da União, o resíduo com potencial infectante a seres humanos ou contaminante ao meio ambiente devem ser processados de forma diferente do comum, sendo necessária a identificação e correta destinação.

O presente trabalho é um treinamento realizado em um laboratório de Microbiologia de Alimentos particular, onde foram ensinados o acompanhamento, a manutenção e os procedimentos para o bom andamento no processamento das mais diversas amostras ingressadas.

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

No curso de Ciências Biológicas há um currículo rico e diverso que propõem um conhecimento idem sobre as formas de vida, sistemas biológicos, evolução e áreas correlatas que são fundamentais para a existência e reprodução de um ser vivo. No entanto, é necessária uma especialização por parte do profissional biólogo, para que se tenha conhecimento mais aprofundado em uma área de interesse.

Reconhecido pelo Conselho Federal de Biologia como microbiologia de alimentos, presente na Resolução N°517, de 07 de julho de 2019, bem como na Resolução N°10, de 05 de julho de 2003, que permite o biólogo exercer o papel profissional em áreas relacionadas a produção e análise de alimentos. Portanto, esse treinamento visou abranger maiores conhecimentos e convivências de um laboratório de microbiologia de Alimentos, sendo ensinados a rotina diária no laboratório, a manutenção deste e produção de meios de cultura essenciais na análise microbiológica, com base nas normas nacionais, internacionais e demais resoluções de órgãos competentes.

3. DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio em treinamento foi realizado dentro do laboratório de microbiologia, que conta com 10 salas organizadas e separadas por função ou etapa de processo de ensaio: Ingresso, Inoculação, Incubação, Leitura e Repique, Analítica, Descontaminação, Esterilização, Preparo

de meio de cultura, Estoque e Amostras e Contraprovas. Tais salas contam com equipamentos, que são regularmente verificados, bem como a temperatura ambiente e água utilizada no laboratório, com a finalidade de que haja conformidade com as normas técnicas nacionais e internacionais.

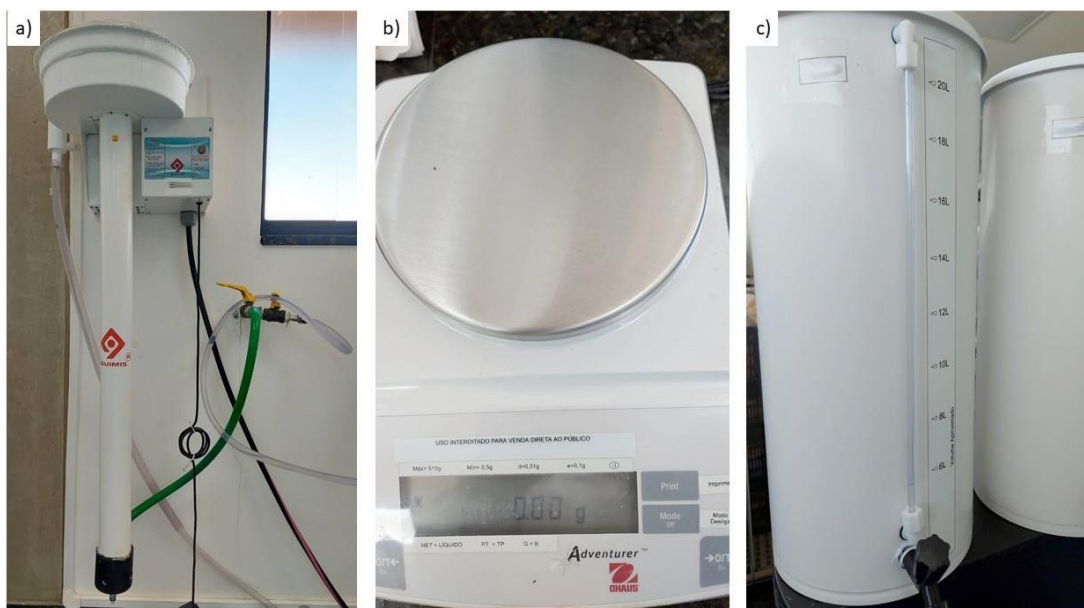
FIGURA I – Fluxo Horizontal



Fonte: Arquivo pessoal

As salas de ingresso, de inoculação, de análise, de incubação e de leitura e repique estão relacionadas ao processo em si do ensaio das amostras. Tais seções são equipadas com capelas de fluxo horizontal (Figura I), balanças de precisão (Figura II-B), geladeiras para armazenamento de meios de cultura e material de apoio refrigerado, estufas para a incubação das amostras, bancadas e demais utensílios.

FIGURA II – Destilador, Balança de precisão e Barrilete

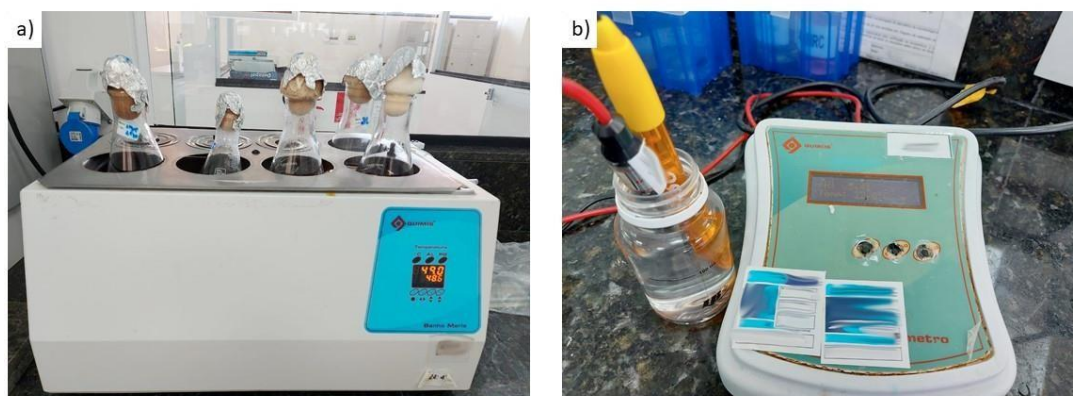


Fonte: Arquivo Pessoal

A sala de preparo de meio de cultura garante o suprimento de meios de cultura necessários de acordo com a demanda. Esta é equipada com um destilador de água simples (Figura II-A), uma balança de precisão (Figura II-B), barriletes em PVC (Figura II-C), medidor de pH de bancada (Figura III-B) e vidrarias e utensílios utilizados extensamente na produção dos meios de cultura. A sala ainda é equipada com duas geladeiras para armazenamento dos meios de cultura - “o estoque”, que fica à disposição dos analistas para plaqueio e inoculação.

As salas de descontaminação e esterilização estão relacionadas à limpeza e esterilização de todos os aparatos (vidrarias, utensílios e demais equipamentos) do laboratório. Além disso, a sala de descontaminação conta com uma autoclave (Figura XI) voltada apenas para esterilização de material que esteve em contato direto com as culturas bacteriológicas e recebe todos os resíduos com potencial contaminante, sendo recolhidos semanalmente por uma terceira empresa especializada no descarte de resíduos biológico.

FIGURA III – Banho-Maria e pHmetro de bancada



Fonte: Arquivo Pessoal

As salas de almoxarifado e a sala de amostras e contraprovas são todas equipadas com refrigeradores e armários para armazenamento de material, amostras e cepas de interesse à área de análise de alimentos. Essas também contam com temperatura ambiente controlada.

4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

4.1. REGISTRO DE TEMPERATURA

Os microrganismos necessitam de quatro fatores principais para crescerem em meio a um substrato, dentre esses fatores, a temperatura confere um estado ótimo para o crescimento de cultura microbológica (MIDIGAN et al., 2016). No geral, quanto mais próximo à temperatura ambiente, mais propício é o crescimento de uma cultura microbológica (GONÇALVES et al., 2017; LE MARC et al., 2021; SAVRAN et al., 2018). No entanto, há microrganismos que possuem uma temperatura ótima de crescimento superior aos 30°C, como por exemplo, os *Geobacillus stearothermophilus*, uma bactéria com alta resistência ao calor, e que inclusive pode ajudar na verificação da qualidade de esterilização a vapor (HUESCA-ESPITIA et. al, 2016). Portanto, a temperatura possui papel fundamental na conservação de qualquer tipo de alimento, sendo um fator importante e que requer atenção para as amostras ingressadas no laboratório.

O registro de temperatura segue as orientações fornecidas pela ISO 17025:2017, como um meio de rastreabilidade metrológica de fatores de influência e relatório destes, e que embasam a confiabilidade nos resultados dos ensaios.

As temperaturas presentes nos termômetros foram registradas diariamente, duas vezes ao dia (manhã e tarde), com exceções de finais de semana e feriados, seguindo orientações das ISO 17025 (2017). Tais registros são parte dos documentos necessários para que o laboratório forneça relatórios técnicos de suas atividades, junto com o monitoramento de fatores que podem influenciar nos resultados obtidos em cada ensaio, incluindo a temperatura que necessita estar em conformidade (ISO 17025, 2017; ISO 7218, 2007).

4.1.1. TEMPERATURA X AMBIENTE

Para cada ambiente no qual esteja inserido, o termômetro (Figura IV) possui faixas de temperaturas aceitáveis, ou seja, de conformidade com a natureza do que está sendo preservado ou processado (Tabela I). Assim, para ambientes comuns, as salas devem estar entre 17 e 27° C, os refrigeradores, entre 2 e 8°C e os freezers, abaixo de -15° C. Para cada registro, são coletados a temperatura mínima e máxima registrada desde a última conferência de temperatura, porém, nos casos de temperatura ambiente ou dos freezers, também são registrados a temperatura que corresponde ao momento da verificação do termômetro (Figura IV), a temperatura atual.

Local do termômetro	Temperatura mínima	Temperatura máxima
ambiente	17 °C	27 °C
geladeira	2 °C	8 °C
freezer	N/A	-15 °C

Tabela I: Relação de intervalos aceitáveis, segundo as normas internacionais

No caso dos refrigeradores, estão inclusos a conservação dos meios de cultura preparados e que ainda não foram utilizados nos ensaios, bem como as amostras ingressadas. É orientado pela ISO 11133-1 (2009) que sejam armazenados em geladeiras a temperaturas de 5° C $\pm$ 3 °C, para manter a integridade do meio e prorrogar a sua validade. Assim como, amostras e swabs precisam também estar dentro desse intervalo de temperatura, como definido pela ISO 7218 (2007). Enquanto em outros casos pode-se necessitar que o conteúdo esteja congelado, por exemplo, as amostras de carne, em que o conteúdo deve ser congelado a -15 °C para uma conservação adequada (ISO 7218, 2007).

Nas seções de trabalho, especificamente as que recebem amostras e onde ocorrem os ensaios, a temperatura ambiente deve proporcionar condições em que minimize as alterações das amostras, permanecendo entre 17 °C e 27° C, de acordo com a ISO 7218 (2007). É importante ressaltar que essa instrução vale somente para amostras que não necessitam de refrigeração específica, como citadas anteriormente, ou que serão administradas nos ensaios.

FIGURA IV – Termômetro digital



Fonte: Arquivo Pessoal

Os termômetros (Figura IV) possuem alguns requisitos internacionais de segurança e confiabilidade para que possam ser utilizados em laboratório (ISO 7218, 2007). Qualquer termômetro deve ser devidamente calibrado, seguindo orientações internacionais, expondo margens de erro, caso o tenha (ISO 7218, 2007). E para fins de segurança é orientado também o descarte imediato e adequado do equipamento, no caso de qualquer avaria nas colunas de mercúrio ou álcool, uma vez que oferecem risco a saúde e não funcionam adequadamente (ISO 7218, 2007). No laboratório em que foi realizado o treinamento, os termômetros são levados para calibração anualmente, por empresas acreditadas pelo Inmetro.

4.2. PREPARO DE MEIO DE CULTURA

Os meios de cultura são fundamentais na análise microbiológica de alimentos, os quais permitem o crescimento de culturas de bactérias e de fungos que podem estar presentes nas amostras. Isso permite a análise e investigação de qualquer eventual contaminação, sendo avaliado a presença de microrganismos da amostra e a contagens destes, seguindo as normas técnicas de análise microbiológica de alimentos (ISO 7281, 2007) e instruções normativas publicados pelo Ministério da Saúde do Governo Federal. Além disso, é importante ressaltar

que as amostras não se restringem a lotes que chegam dos clientes da empresa, mas que também são coletadas dentro do próprio laboratório. Assim, serve como um meio de monitorar a esterilidade do ambiente laboratorial, que correspondem as bancadas, fluxos e salas.

4.2.1 MEIO DE CULTURA

Um meio de cultura é uma fórmula constituída por substâncias naturais e sintéticas, podendo ser encontrada nas formas sólidas, semissólidas ou líquidas (ISO 11133-1, 2014). Majoritariamente os meios de cultura, ou “meios”, possuem a função de viabilizar um ambiente de crescimento de culturas microbiológicas específicas ou generalizadas.

Os meios foram preparados a partir das prioridades e demandas conforme as amostras ingressaram no laboratório. Determinados meios podem possuir alta prioridade, em que geralmente são preparados e plaqueados a partir do momento em que a amostra ingressa no laboratório, atendendo as normas técnicas de armazenamento do meio (ISO 11133-1) e instruções oferecidas pelo fabricante. Porém, há uma maioria que pode ser preparado alguns dias antes, de forma que estejam sempre disponíveis para a difusão e plaqueio.

Geralmente, os meios de cultura que possuíam alta prioridade foram feitos ainda pela manhã, para que estivessem disponíveis pelo resto do dia. Enquanto os meios que poderiam ser armazenados por alguns dias foram feitos durante a tarde, de forma a atender o “estoque”. Esses serviram para a reposição nas geladeiras, podendo ser descartado o lote, caso esse ultrapasse o tempo de até duas semanas, conforme orientado pela ISO 11133-1:2014.

Dentro do laboratório, os meios de cultura podem ser divididos em dois tipos básicos, ágares e caldos. Os ágares são, com poucas exceções, utilizados em placas de Petri descartáveis. Enquanto os caldos, são inseridos em tubos de ensaio, em que a quantidade depende da instrução do procedimento. Em alguns casos, os caldos podem também ser armazenados em frascos de reagente graduado, em uma pequena variedade de volumes.

Além desses, ainda há um tipo particular de caldo - a água peptonada tamponada, a qual é utilizada como meio de transporte dos microrganismos presentes nas amostras, de forma que não se proliferem, mas que estejam viáveis no momento da inoculação (ISO 11133-1, 2014).

4.2.2 DO PREPARO

A forma de preparo segue os padrões técnicos da ISO 11133-1 e ISO 11133-2, sob as condições técnicas estabelecidas pela ISO 7218 e ISO 17025. Os meios de cultura do laboratório onde foi feito o treinamento são do tipo desidratados, os quais necessitam de adição de água para a difusão. Essas são feitas seguindo as orientações do fabricante junto às normas e orientações estabelecidas pela norma técnica ISO 11133-1.

Antes de começar o preparo do meio de cultura microbiológico, foram registrados o momento de abertura e o lote disponibilizado pelo fabricante, como orientado pela norma ISO 17025:2017 e ISO 11133-1:2014, servindo não só como um meio de registro técnico para a rastreabilidade do lote do meio, que eventualmente pode interferir nos resultados (ISO 17025, 2017), mas também como uma forma de garantir o controle do estoque disponível em laboratório. O meio de cultura, então, é precisamente pesado, atendendo a proporção indicada pelo fabricante (ISO 11133-1, 2014). Assim que hidratado com água destilada, caso necessite, este é levado para a difusão em banho-maria – método aplicado a todos os ágaros preparados em laboratório.

Em seguida, após retirado do banho-maria e resfriado a temperatura ambiente, são coletadas pequenas amostras do meio para checagem do pH. O intervalo de pH esperado é disponibilizado nas instruções colocadas pelo próprio fabricante. No caso de estar fora de seu intervalo, pode se corrigir com algumas gotas de ácido (1N de HCl) ou base (1N de NaOH) a depender da situação, seguido de uma nova checagem (ISO 11133-1, 2014).

Dentro do intervalo de pH esperado, pode ser exigido que o meio esteja esterilizado, levando-o a autoclave. Esse equipamento também possui um intervalo de valores de temperatura aceitáveis internacionalmente, com o fim de adequada esterilização, sendo o valor mínimo de $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, à 1 atm., durante 15 minutos ininterruptos (ISO 7218, 2007; ISO 11133-1, 2009). Terminado o ciclo de autoclave, é coletado uma nova amostra para checagem do pH. Se estiver fora do intervalo, pode ser corrigido com ácido ou base previamente esterilizados, se não, pode ser disponibilizado na utilização dos ensaios microbiológicos (ISO 11133-1, 2014).

4.2.3 PRINCIPAIS MEIOS PREPARADOS E FUNÇÕES

4.2.3.1. ÁGUA PEPTONADA TAMPONADA (APT)

Uma das etapas mais importantes na análise microbiológica de alimentos, é a diluição das unidades analíticas após o ingresso. Essa etapa consiste no condicionamento de um meio de cultura não seletivo, que retire qualquer microrganismo viável da amostra, mas que se reproduza somente na inoculação em meio de cultura seletivo propriamente dito.

A água peptonada tamponada (APT), é utilizada como um meio de cultura de pré-enriquecimento não seletivo (Figura V) de *Salmonella* spp. No entanto, este mesmo meio é recomendado pela ISO 6887-1 (2017) como um diluente para diluição e homogeneização de amostras. Por esse motivo, durante o treinamento foram feitas grandes quantidades desse meio de cultura utilizado amplamente nas mais diversas amostras líquidas e sólidas.

FIGURA V – Frasco de Reagente Graduado



Fonte: Arquivo Pessoal

A formulação de peptona com cloreto de sódio (sal) e fosfato, permitem que o microrganismo tenha um acesso mínimo a nutrientes que o mantenha viável, ao mesmo tempo que o sal e o fosfato atuam de maneira a manter o equilíbrio osmótico da célula, e como um agente tamponante, fazendo com que o pH não se altere, e por consequência, não interfira na viabilidade do microrganismo (DA SILVA et al., 2010).

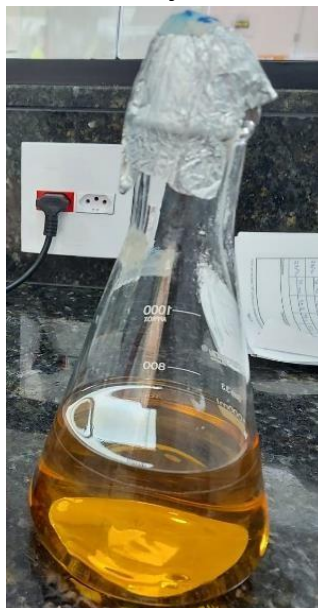
A APT (Figura V) pode atender os diversos pré-requisitos dos ensaios e procedimentos do laboratório, a depender do tipo de ensaio e da natureza da amostra. Para isso, no caso de

frascos de reagente graduado, eram preparados três tamanhos básicos desse meio, com 375 ml, 225 ml, 90 ml. Enquanto, no caso dos tubos, eram colocados 9 ml do diluente. Sendo os de frascos enchidos adequadamente a cada volume (500 ml, 250 ml e 100 ml, respectivamente), enquanto os de 9 ml foram feitos com tubos de 20 ml.

4.2.3.2. PLATE COUNT AGAR (PCA)

O PCA (Figuras VI - VII) é um meio de cultura voltado para a contagem Padrão em Placas, também conhecido como contagem total de aeróbios mesófilos (LABORCLIN, 2018). Tais tipos de colônias crescem em temperaturas próximas à do ambiente (25 °C), e por isso a utilização do PCA pode ser considerada um padrão geral para uma variedade de bactérias, na análise de alimentos (DA SILVA et al., 2010).

FIGURA VI – Erlenmeyer com PCA difundido



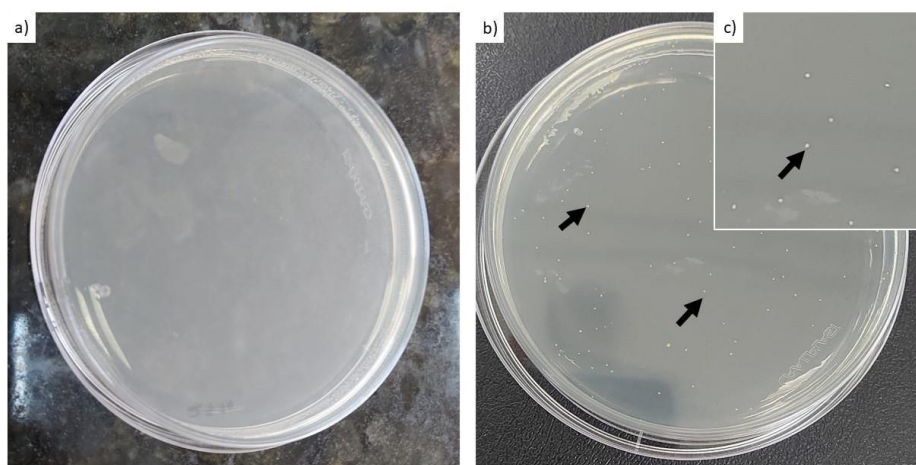
Fonte: Arquivo Pessoal

Esse meio de cultura, é um formulado de peptonas, dextrose, extrato de levedura e ágar (LABORCLIN, 2018). As peptonas fornecem os aminoácidos necessários para os microrganismos formarem suas colônias, enquanto a dextrose serve como fonte de energia, e o extrato de levedura, disponibiliza o complexo de vitamina B (LABORCLIN, 2018).

Esse meio de cultura também é utilizado na avaliação da esterilidade do ambiente laboratorial, tanto das salas que compõem o laboratório, quanto dos fluxos e geladeiras. Assim, algumas placas são abertas num intervalo de uma hora dentro das salas, que permanecem fechadas durante esse período. Enquanto são coletadas amostras das bancadas e equipamentos, com *swab*, que serão levados para inocular posteriormente em PCA.

O plaqueio para a contagem total de aeróbios mesófilos pode ser feito a partir de dois métodos: *pourplate* ou *spread plate* (DA SILVA et al., 2010). No método *pourplate*, ou plaqueamento em profundidade, o meio de cultura - PCA, é misturado em uma placa de Petri, com a diluição de amostra previamente feita. Assim que ocorre a inoculação, a placa é mexida em um lugar plano promovendo a homogeneização do meio de cultura com a diluição.

FIGURA VII – Placa de Petri com PCA solidificado



Nota: Na Figura VII-B e na Figura VII-C é possível observar pequenas pontuações brancas que indicam formação de colônias microbológica; Fonte: Arquivo Pessoal.

O *spread plate*, ou plaqueamento em superfície, diferentemente do método anterior, faz-se o plaqueamento antes da inoculação da diluição de amostra. Isto é, a inoculação da amostra só é feita quando o meio de cultura estiver solidificado. Assim que inoculado, a diluição é espalhada pela placa com o auxílio de uma alça de Drigalski até que o líquido seja absorvido pelo PCA. O diferencial entre essas duas técnicas está na possibilidade de conservar mais microrganismos viáveis no método de superfície, uma vez que a amostra não entra em contato com um meio de cultura em altas temperaturas (DA SILVA et al., 2010).

4.2.3.3. ÁGAR MANITOL GEMA DE OVO POLIMIXINA (MYP)

Considerado um meio de cultura seletivo, o MYP é dotado de compostos que tem o propósito de isolar bactérias do grupo *Bacillus cereus* nas amostras de alimentos (LABORCLIN, 2018). Tal espécie é de interesse de entidades e autoridades de saúde pública nacionais e internacionais, que estabelecem padrões de conformidade no número de unidades formadoras de colônia (UFC) em uma variedade de alimentos. No Brasil, esses padrões podem ser encontrados na Instrução Normativa N°60, de 23 de dezembro de 2019, publicado no Diário Oficial da União.

FIGURA VIII – Erlenmeyer com MYP difundido



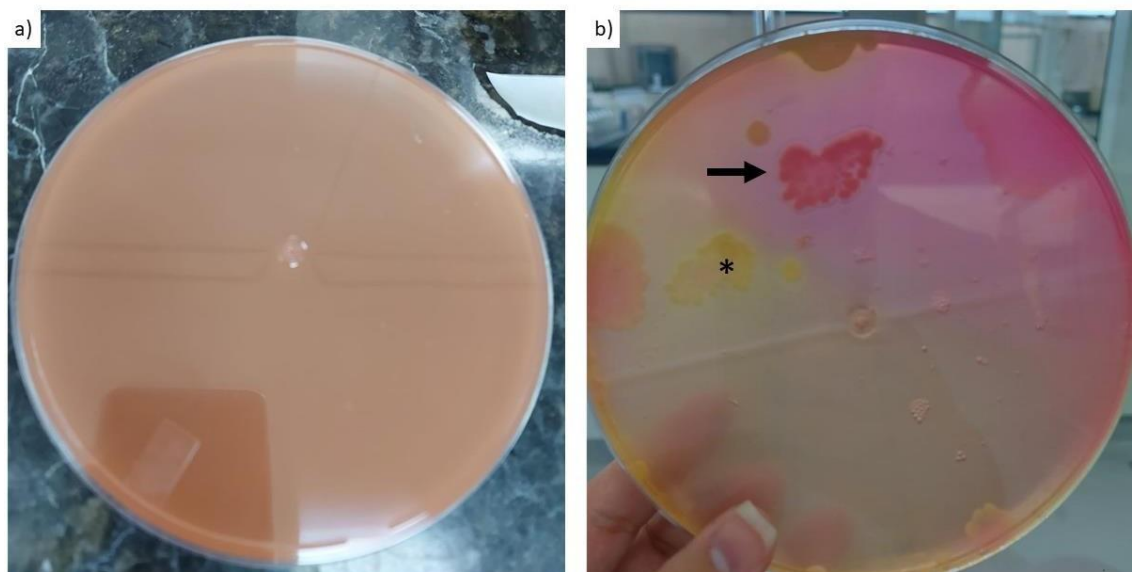
Fonte: Arquivo pessoal

O grupo de *B. cereus* são bactérias gram-positivas, em forma de bastonetes, com capacidade de formar esporos e anaeróbias facultativas (ASH et al., 1991; BOTTONE, 2010). Tal grupo pode ser encontrado em uma variedade grande de alimentos – principalmente frescos, que são deixados em temperatura ambiente por muito tempo, podendo causar intoxicações alimentares com sintomas de vômito, náusea e diarreia (CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION, 2021).

O meio de cultura MYP possui manitol e lecitina em sua composição, dois compostos chave para a diferenciação de uma colônia de *B. cereus* das restantes (LABORCLIN, 2018). O manitol pode ser fermentado por qualquer bactéria, com exceção do grupo alvo que não o faz, enquanto as *B. cereus* hidrolisam a lecitina, formando a lecitinase (DA SILVA et al., 2010) .

No entanto, a lecitina não está presente na composição de fábrica do meio, exigindo a suplementação esterilizada com gema de ovo. Quando as *B. cereus* estão presentes na amostra (Figura IX-B), é possível identificá-las nas placas pela formação de UFC com um halo de coloração rosa, enquanto as demais – que devem fermentar o manitol, devem apresentar uma coloração amarelada (CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION, 2021).

FIGURA IX – Placa de Petri com MYP solidificado



Nota: Na Figura IX-B é possível observar a formação das colônias de *Bacillus cereus* apontadas pela seta, enquanto na região amarelada (asterisco) são outras colônias, que fermentam o manitol ; Fonte: Arquivo Pessoal.

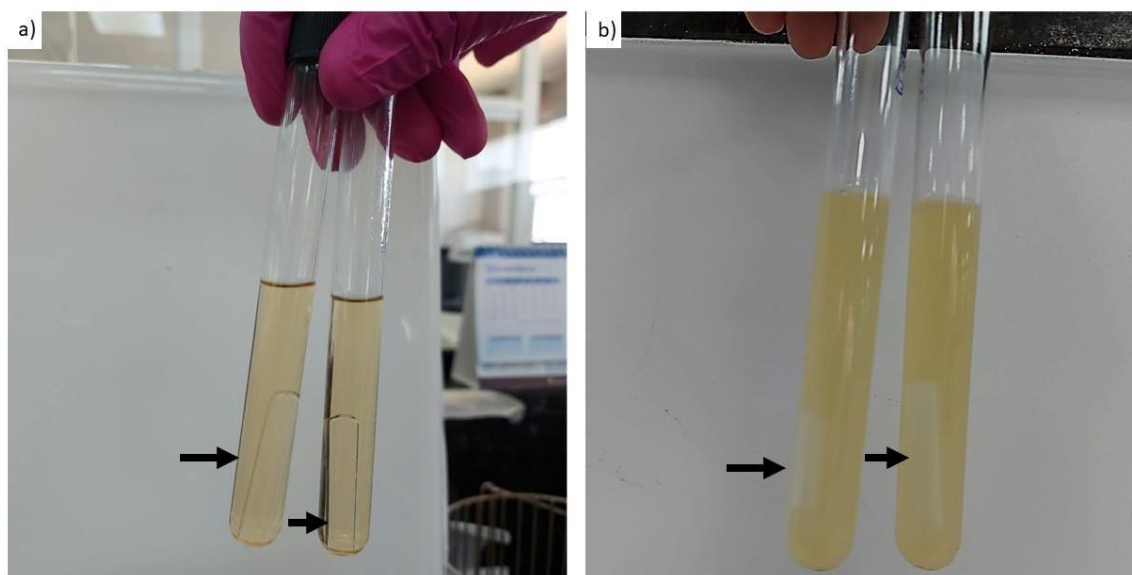
4.2.3.4. CALDO LAURIL SULFATO

É um meio de cultura seletivo do tipo caldo, voltado para contagem de bactérias do grupo dos coliformes totais, em água e alimentos (NEOGEN, 2010). Os coliformes totais são compostos por bactérias gram-negativas, com formas de bastonetes, não esporogênicos, anaeróbios-facultativos, com capacidade de fermentação da lactose, liberando gases e ácidos (CARDOSO et al., 2010). O Caldo Lauril Sulfato (Figura X), é utilizado em testes presuntivos – para avaliação de presença, a partir da observação da fermentação da lactose que está presente em sua composição (DA SILVA et al., 2010).

O Lauril, fora dos laboratórios de microbiologia, é popularmente usado em saboarias artesanais devido à sua propriedade formar bolhas e espuma, sendo um detergente comum e barato. A aplicação do ensaio com o Lauril consiste na confecção de tubos esterilizados do

meio, com tubos de Durham no interior, e se utiliza da propriedade tenso ativa do Lauril, com a fermentação de lactose feita pelos coliformes para detectar a presença desses microrganismos. A partir das bolhas capturadas pelo tubo de Durham, a diluição é dividida em algumas alíquotas que poderão expressar mais ou menos fermentação da lactose, levando a o cálculo de probabilidade do número mais provável (NMP)/ g ou ml (DA SILVA et al., 2010).

FIGURA X – Tubos contendo Lauril Sulfato com durham



Nota: Na Figura X-A a na Figura X-B é possível observar os tubos de Durham no interior dos tubos, os quais capturaram (coloração mais clara no interior do durham) o gás de origem da fermentação da lactose feitas pelos microrganismos presentes na amostra; Fonte: Arquivo Pessoal.

4.2.4. BIOSSEGURANÇA, DESCONTAMINAÇÃO E ESTERILIZAÇÃO

Nas salas de descontaminação e esterilização são realizados procedimentos relacionados ao reaproveitamento de materiais duráveis utilizados nos ensaios, por exemplo: as vidrarias, os utensílios e copos de Becker, que apesar de serem feitos de plástico apresentam boa durabilidade e esterilidade após o processo de esterilização. Enquanto outros materiais descartáveis, na sua maioria resíduos, são separados para o correto descarte e se possível esterilização a vapor na autoclave (Figura XI).

O processo de limpeza e biossegurança aplicado foi baseado na ISO 7218 (2019) e no capítulo 25 do livro “Manual de Métodos de análise Microbiológica de Alimentos e Água” (DA SILVA et al., 2010), dedicado exclusivamente para a descontaminação, descarte, esterilização e verificação de esterilização do material utilizado para análises microbiológicas.

4.2.4.1. BIOSSEGURANÇA

Um laboratório de microbiologia é constituído de uma atividade que pode expor o seu respectivo profissional aos mais diversos riscos de acidentes e infecções causadas pelo material de trabalho. Nesse sentido, no Brasil, foram estabelecidas normas e recomendações a níveis Federais, com a intenção de garantir a segurança da população e meio ambiente, através de recomendações, normas e fiscalização instituídas em todo o país. Foi então, criada a Lei Nacional de Biossegurança, Nº 11.105, de 24 de março de 2005, que estabelece as normas de segurança e a criação da Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio), o Conselho Nacional de Biossegurança e a Comissão Interna de Biossegurança (CIBio).

O conceito de biossegurança é a combinação de conhecimentos e práticas, equipamentos de segurança, instalações laboratoriais e recomendações para prevenção de acidentes (BRASIL, 2006). Em 2010, o Ministério da Saúde, através da Comissão de Biossegurança em Saúde, publica as “Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção de Agentes Microbiológicos” (BRASIL, 2010). Por meio delas, é possível classificar o Nível de Biossegurança, através das técnicas utilizadas em laboratório, bem como os agentes biológicos envolvidos, estabelecendo quatros níveis de biossegurança: NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4 (BRASIL, 2010).

No laboratório em que foi realizado o treinamento, o Nível de Biossegurança enquadrado é o de nível 2 (NB-2), que possui agentes biológicos que oferecem risco moderado aos profissionais e ao ambiente (BRASIL, 2010). Dessa forma, fica estabelecido ao profissional o uso obrigatório de jalecos de manga comprida, luvas descartáveis, óculos de proteção e máscaras (BRASIL, 2010). Além disso, é altamente recomendado que o profissional esteja imunizado contra agentes biológicos que possam ser manipulados em laboratório, ou que podem estar presentes em material contaminado (BRASIL, 2010).

Para as instalações, é de extrema importância que todos os equipamentos estejam limpos, com a calibração em dia e sejam utilizados sistemas de luz ultravioleta de forma controlada (BRASIL, 2010). Os procedimentos de um laboratório NB-2 devem ser feitos a portas fechadas com cuidado para a não formação de gotículas e aerossóis, sempre com equipamentos de proteção individual, seguido de correto descarte após o uso (BRASIL, 2010). Além disso, é necessário que tenha autoclaves à disposição do laboratório, com a finalidade de descontaminar qualquer material ou resíduo gerado nos procedimentos de rotina (BRASIL, 2010).

4.2.4.2. LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO

Após os procedimentos de ensaio microbiológico feitos em laboratório, todo o material utilizado é destinado à sala de descontaminação, onde serão devidamente separados para limpeza ou o correto descarte.

As vidrarias, os utensílios, e outros equipamentos duráveis foram lavados e esterilizados na sala de descontaminação. Esses objetos são primeiramente enxaguados com água da torneira e ensaboados em seguida, com solução (20%) de detergente neutro. É então enxaguado entre 5 e 7 vezes para remoção total do sabão e qualquer possível resíduo. Os objetos lavados passam pela água destilada duas vezes, onde sofrem um processo de desmineralização, tornando-os mais estéreis possível. Por fim, os objetos estéreis foram encaminhados para a sala de esterilização e guardados em estufas para secagem completa.

Além disso, tubos de ensaio e garrafas graduadas (*bowls*) são submetidas ao processo de esterilização a vapor, na autoclave, a 121°C, durante 30 minutos, à 1Atm. Somente após esse ciclo, o conteúdo interno pode ser externado para descarte, seguido de limpeza.

As tampas de tubos e de garrafas graduadas (*bowls*) são submersos por 30 minutos em solução 15% de hipoclorito de sódio, em seguidas são banhados sete vezes em água comum a fim de retirar qualquer resíduo. Por fim, as tampas são submersas duas vezes em água destilada, a fim de desmineralizá-las.

4.2.4.3. LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DE EQUIPAMENTOS

Além das vidrarias e utensílios a serem limpos e descontaminados, outros itens presentes nos procedimentos diários do laboratório também necessitam de limpeza e manutenção. É o caso de autoclaves (Figura XI), barriletes (Figura II-C) e banho maria (Figura III-A). Esses equipamentos necessitam de limpeza técnica a fim de que não haja contaminação cruzada ou danos aos mesmos, que podem consequentemente diminuir o tempo de vida do equipamento.

As autoclaves foram lavadas todas as sextas-feiras, após o uso. Para isso, o equipamento era esvaziado completamente e deixado esfriar. Em seguida era preenchido com solução limpador de uso geral de painéis, seguindo as especificações do fabricante. Dessa forma eram retirados resíduos mais grosseiros e difíceis de limpar com bucha e detergente neutro. Após seis horas em solução, era aberto o registro da autoclave (Figura XI) para que fosse retirado toda água com os resíduos desincrustados. Em seguida, o cesto e base foram removidos da autoclave (Figura XI) para a lavagem com bucha e solução de detergente a 20%, que, após enxaguados,

foram reservados para secagem. As autoclaves (Figura XI) também são esfregadas internamente com solução de detergente, a qual é preenchida com água potável, pelo menos três vezes, para a remoção de toda a espuma pela passagem do registro. Por fim, após toda a remoção da espuma, a autoclave (Figura XI) é enchida novamente com água para o uso regular.

FIGURA XI – Autoclave



Fonte: Arquivo Pessoal

No caso dos barriletes, eram totalmente esvaziados, suas torneiras desrosqueadas e suas tampas retiradas, a fim de limpar as partes separadamente. Os barriletes foram ensaboados com solução 20% de detergente e completamente enxaguados, até que toda a espuma saísse. Em seguida, todas as partes eram submersas ou preenchidas em solução 10% de hipoclorito de sódio – água sanitária, e ficaram reservadas por 30 minutos. Após o tempo de descanso em solução, os barriletes eram enxaguados com água potável por sete vezes, seguidos de uma oitava vez com água destilada.

Enquanto nos banhos-maria (Figura III-A), eram esvaziados através dos registros laterais e suas partes móveis eram retiradas e separadas para lavagem. Em seguida, o equipamento e suas peças móveis eram ensaboados com solução de detergente 20% e enxaguados até que toda a espuma e sabão tenham saído. Após a lavagem com o detergente, os barriletes (Figura II-C) e demais peças são cheios ou submersos em solução de hipoclorito 5%,

sendo reservados por 30 minutos. Enquanto na região externa do equipamento foram borrifados álcool 70% e deixadas secar naturalmente. Por fim, é deixada a solução escoar pelo registro e em seguida é enxaguado três vezes para remoção total de solução. Somente após esse processo, os banhos-maria (Figura III-A) foram cheios com água destilada novamente.

4.2.4.4. MANEJO DE RESÍDUOS INFECTANTES

Os resíduos gerados pelo laboratório de microbiologia, são considerados “resíduos do serviço de saúde”, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA Nº 306/04 e Resolução CONAMA Nº358/2005, que classificam os resíduos em cinco grupos: A, B, C, D e E (FONSECA, 2009). O grupo de resíduo do laboratório de microbiologia é o grupo A, o qual abrange resíduos que podem possuir agentes biológicos, com potencial risco de infecção (FONSECA, 2009).

Diferentemente do resíduo comum, o resíduo infectante deve ser separado e identificado em sacos brancos, contendo o símbolo de substância infectante, com rotulagem branca. Esse é recolhido por empresas especializadas e preparadas para transportá-lo, e por fim tratá-lo. No contexto do laboratório, foram considerados lixo biológico a ser descartado: ponteiros descartáveis, luvas, amostras biológicas, e quaisquer itens descartáveis que tenham participado diretamente com o material biológico dos ensaios microbiológicos.

No entanto, alguns resíduos não precisam ser descartados de forma especializada se forem corretamente tratados. Dessa forma, é possível alocá-lo na circulação regular de resíduos sólidos no caso de tratamentos térmicos ou químicos (FONSECA, 2009). No laboratório de microbiologia onde foi realizado o treinamento, as placas de Petri e algumas amostras, após os procedimentos, foram levadas à autoclave (Figura XI) e submetidas a pressão de 1 Atm. a 121°C, por 30 minutos, seguindo as recomendações da ISO 7218:2019. Isso permite a inativação por vapor de boa parte dos microrganismos presentes no resíduo, diminuindo a carga microbiológica no lixo.

5. DISCUSSÃO

Durante o período de estágio, foram vivenciados as mais diversas experiências e adversidades encontradas em laboratório. Por ser tratar de um laboratório particular, o volume de tarefas e atividades dependia diretamente do ingresso de amostras feitos no laboratório.

Portanto, em alguns momentos, a maior dificuldade na prática se restringiu ao tempo, uma vez que todas as atividades necessitam de cuidado aos detalhes para que todo um processo não seja perdido.

O preparo do meio de cultura foi uma das atividades que mais ocupavam tempo. Por dependerem diretamente da demanda de amostras e determinados procedimentos, exigia-se agilidade no preparo dos mais variados meios de cultura, para que fossem entregues até o fim do dia. Uma maneira de agilizar o processo, era fazer a proporção de meio de cultura e água na própria calculadora, porque não era necessário esperar o computador responder ou procurar a seção do meio de cultura em meio a tantas no arquivo Excel. Somente quando o fosse retirar o pH dos meios preparados, esses eram devidamente registrados.

O registro diário nos termômetros foi por vezes uma tarefa muito repetitiva e que requiriu bastante tempo, devido ao grande número de dispositivos a serem verificados. Apesar de ser repetitivo, ainda necessita de atenção, uma vez que em algumas situações é possível acompanhar a variação de temperatura e identificar um possível evento adverso - quando um termômetro pode registrar uma temperatura fora da conformidade. Nesses casos, era comunicado a um superior e em seguida verificados a data de limpeza do refrigerador e seu estado atual, o posicionamento do termômetro e, por fim, colocado um segundo termômetro próximo ao principal, na intenção de comparar os resultados e descobrir a causa do problema.

Nas salas de descontaminação, era necessário que estivesse atento ao que estivesse faltando dentro do laboratório, exigindo atenção ao material reutilizável que precisava ser limpo primeiro. Em situações em que a sala se encontrava cheia de material contaminado e sujo, era necessário limpar os objetos que ocupavam grande volume, por exemplo: Erlenmeyer, Copos de Becker de 4000 ml, bandejas e frascos de reagente graduado. Nesse sentido, alguns vários objetos menores poderiam não ser limpos de imediato, porém esses entram com maior prioridade para uma limpeza posterior. É importante enfatizar que na descontaminação, o foco é sempre pensar nas rotinas futuras do laboratório, uma vez que todo o material a ser limpo, precisa estar limpo, esterilizado e seco para quando novos procedimentos sejam demandados.

Para todas essas atividades, além de agilidade e decisões assertivas, era de vital importância estabelecer boa comunicação com a equipe do laboratório, estar atento as demandas, saber lidar com eventos adversos e sincronizar todas as atividades para que funcionassem de forma simultânea, tirando o maior aproveitamento possível do tempo.

6. CONCLUSÕES

Durante o estágio foram ensinados e praticados diariamente atividades relacionadas à boa manutenção de um laboratório de microbiologia e a participação direta no preparo de meio de cultura escalados para as análises das amostras ingressadas. Além disso, todas as atividades demandaram conceitos de boa gestão de tempo e tomada de decisão, bem como gerenciamento de crises causados por eventos adversos. Foi também vivenciado o dia a dia de uma variedade de colaboradores que precisam sempre estar atentos aos detalhes, com dedicação ao processo, pragmáticos em seus protocolos e preparados para qualquer adversidade que aparecesse. Nesse sentido, o treinamento não somente envolveu as práticas propostas no plano de atividades, mas a experiência de participar de uma equipe de laboratório, com papel importante e fundamental para o bom andamento de todos os procedimentos demandados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASH, CAROL; FARROW, JOHN A.; DORSCH, MATTHIAS; STACKEBRANDT, ERKO; COLLINS, MATTHEW D. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **Int J Syst Bacteriol.** v. 41(3), p.343-346, 1991.

BOTTONE, EDWARD J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clin Microbiol.** v. 23(2), p. 382-98, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia.** 3ª ed. Brasília – DF: Editora MS, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA EM SAÚDE (CISBio). **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos.** 3ª ed. Brasília – DF: Editora MS, 2010.

CARDOSO, ANA LÚCIA SICCHIROLI P.; TESSARI, ELIANA NEIRE C.; CASTRO, AANTONIO GUILHERME M.; KANASHIRO, ANA MARIA I.; GAMA, NILCE MARIA SOARES Q. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descavado. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 19-22, 2001.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. **BAM Chapter 14: Bacillus cereus.** Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

CONSELHO FEDERAL DE BIOLOGIA. Resolução nº10, de 05 de julho de 2003. Dispõe sobre as Atividades, Áreas e Subáreas do Conhecimento do Biólogo.

CONSELHO FEDERAL DE BIOLOGIA. Resolução nº177, de 05 de agosto de 2019. Dispõe sobre a atuação do Biólogo em Biotecnologia e Produção e dá outras providências.

FONSECA, JANAÍNA CONRADO LYRA DA. **Manual de gerenciamento de resíduos perigosos.** São Paulo - SP: Cultura Acadêmica, 2009.

FORSYTHE, STEPHEN J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ª ed. Artmed Editora, Porto Alegre – RS, 2013.

DA SILVA, NEUSELY; JUNQUEIRA, VALÉRIA CHRISTINA A.; DE ARRUDA SILVEIRA, NELIANE F.; TANIWAKI, MARTA H.; GOMES, RENATO AABEILAR R.; OKAZAKI, MARGARETE M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª ed. Santa Maria – RS: Editora Blucher, 2010.

GONÇALVES, LETÍCIA DIAS A.; PICCOLI, ROBERTA HILSDORF; PERES, ALEXANDRE DE PAULA; SAÚDE, ANDRÉ V. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. **Brazilian journal of microbiology**, v. 48(2), p. 352–358, 2017.

HUESCA-ESPITIA, LUZ DEL CARMEN.; KORZA, GEORGE; ROSENBECK, KATIA A.; SUVIRA, MILOMIR; SETLOW, BARBARA; SETLOW, PETER; WANG, SHANJIE; LI, YONG-QIANG; WENRU, LI. Effects of steam autoclave treatment on *Geobacillus stearothermophilus* spores. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1300-1311, 2016.

LABORCLIN. Plate Count Agar. Rev. 08. Pinhais - PR, 2018.

LE MARC, YVAN; DA SILVA, NATHÁLIA BUSS; POSTOLLEC, FLORENCE; HUCHET, VÉRONIQUE; BARANYI, JÓZSEF; ELLOUZE, MARIEM. A stochastic approach for modelling the effects of temperature on the growth rate of *Bacillus cereus* sensu lato. **International Journal of Food Microbiology**, v. 349, 2021.

MADIGAN, MICHAEL T., MARTINKO, JOHN M., BENDER, KELLY. S., BUCKLEY, DANIEL H.; STAHL, DAVID A. **Microbiologia de Brock**. 14ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 158, 2016.

SAVRAN, DERYA; PÉREZ-RODRÍGUEZ, FERNANDO; HALKMAN, ABDULKADIR. Modelling survival of *Salmonella* Enteritidis during storage of yoghurt at different temperatures. **International journal of food microbiology**, v. 271, p. 67-76, 2018.

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**. Genebra, Suíça. 2017.

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TS 11133-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media**. Genebra, Suíça. 2019.

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations**. Genebra, Suíça. 2007.