

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

Mariana Camille de Melo Moura

**VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE MÉTODO ANALÍTICO DE  
CONTAGEM DE *Bacillus cereus* PRESUNTIVO A PARTIR DE ALIMENTOS**

Rio de Janeiro

2024

Mariana Camille de Melo Moura

VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE MÉTODO ANALÍTICO DE CONTAGEM  
DE *Bacillus cereus* PRESUNTIVO A PARTIR DE ALIMENTOS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Silvia Maria dos Reis Lopes

Preceptor: Nathalia G. Santos Caldeira

Rio de Janeiro

2024

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Moura, Mariana Camille de Melo

Verificação de desempenho de método analítico de contagem de *Bacillus cereus* presuntivo a partir de alimentos. / Mariana Camille de Melo Moura. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2024.

31 f. : il. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2024.

Tutora: Silvia Maria dos Reis Lopes

Preceptor: Nathalia G. Santos Caldeira

1. Métodos. 2. *Bacillus cereus*. 3. Análise de Alimentos. I. Título.

Verification of performance of analytical method for counting presumptive *Bacillus Cereus* from food

Mariana Camille de Melo Moura

VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE MÉTODO ANALÍTICO DE CONTAGEM  
DE *Bacillus cereus* PRESUNTIVO A PARTIR DE ALIMENTOS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lucia Helena Pinto Bastos  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

MSc. Rodrigo Domingos Overa Tavares  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Dra. Joana Angélica Barbosa Ferreira  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Dra. Silvia Maria dos Reis Lopes (Tutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

MSc. Nathalia Gonçalves Santos Caldeira (Preceptora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita e Ricardo, por sempre priorizarem a minha educação e não medirem esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos, sendo sempre meu porto seguro. Obrigada por todo amor e apoio, vocês são meus exemplos e incentivo.

Aos meus irmãos e sobrinhos por serem meus maiores fãs e falarem de mim para todos com tanto orgulho, a determinação de vocês me motiva e o apoio incondicional me fortalece.

Ao meu namorado, Daniel, pelo carinho, apoio, compreensão e incentivo na busca da realização dos meus objetivos.

Aos meus amigos do laboratório, Jéssica, Marcielli, Rodrigo, Larissa, Maria Luiza e Júlia, por terem me ensinado tanto sobre microbiologia, sobre “fazer ciência” e sobre trabalho em equipe, vocês alegraram os meus dias. Não posso esquecer das meninas do agrotóxico (Larissa e Letícia) que fechavam a nossa panelinha do bloco 2 e ajudavam a fazer da nossa mesa a mais feliz do refeitório.

Aos meus amigos de turma, em especial, Aline, Caroline, Isadora, Lara, Larissa e Rafael, sem vocês essa trajetória não teria sido tão leve e feliz. Obrigada por todos os almoços, lanchinhos e Karaokê, por todas as conversas no nosso grupo, por toda a cumplicidade e parceria, vou levar todos vocês comigo para o resto da minha vida.

À minha orientadora, Silvia Maria dos Reis Lopes que tanto me ensinou não só sobre microbiologia, mas também sobre comprometimento, responsabilidade e trabalho em equipe. Agradeço também por me permitir crescer cada vez mais profissionalmente.

À minha preceptora Nathalia Gonçalves por todo apoio, ensinamentos e conversas incentivadoras.

Aos setores de meio de cultura e esterilização, por serem sempre tão solícitos e carinhosos, por atenderem prontamente a todos os meus pedidos e procurarem sempre ajudar.

Ao Ministério da Saúde pela bolsa concedida.

Ao INCQS por dar esta oportunidade única e incrível.

## RESUMO

A verificação de método é um processo pelo qual um laboratório busca a confirmação de desempenho de um método já validado, garantindo que os dados obtidos atendem os requisitos específicos do ensaio normalizado. Este processo é uma exigência da NBR ABNT ISO 17025:2017 que é o sistema da qualidade amplamente utilizado em laboratórios de ensaio. O objetivo do presente trabalho foi verificar se o método descrito no POP 65.3240.003 que é baseado na ISO 7932:2004 – Método horizontal para a enumeração presuntiva de *Bacillus cereus* – Técnica de contagem de colônias a 30°C, atende aos parâmetros para métodos quantitativos do DOQ-CGCRE-089. Este documento orienta sobre avaliação de desempenho de métodos analíticos voltados para a área de microbiologia que para métodos quantitativos, avalia os parâmetros repetibilidade e reprodutibilidade. Foi elaborado um protocolo com todos os parâmetros da verificação do ensaio de contagem de *Bacillus cereus* presuntivo realizado pela técnica de semeadura em superfície, em meio ágar manitol gema de ovo com polimixina (MYP). Como matriz foi utilizado leite desnatado estéril contaminado artificialmente com microrganismos de referência certificados (MRC) a uma concentração pré-estabelecida, sendo o microrganismo alvo *Bacillus cereus* MRC ATCC 11778 e o interferente *Staphylococcus aureus* MRC ATCC 6538. A repetibilidade foi realizada pela análise de 10 amostras pelo mesmo analista, utilizando meios de cultura, diluentes e vidrarias de mesmo lote num curto período. A reprodutibilidade foi realizada por dois analistas, utilizando as mesmas amostras, 10 para cada analista, mesmos lotes de insumos, e mesmo equipamento e no mesmo dia. Os critérios de desempenho estão descritos na ISO 7932:2004 que determina para repetibilidade ( $r$ ) que a diferença em  $\log_{10}$  dos valores das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas, não deve ser superior a 0,29 em 95% dos casos analisados na verificação do método. Para o limite de reprodutibilidade ( $R$ ) esse valor não deve ser superior a 0,42 em 95% dos casos analisados. Os resultados obtidos, foram 100% das amostras analisadas na repetibilidade tiveram resultados iguais ou inferiores a 0,29 e 100% das amostras analisadas na reprodutibilidade tiveram resultados inferiores a 0,42. Após análise dos cálculos dos critérios de aceitação da avaliação de desempenho, conclui-se que o método utilizado para a contagem de *Bacillus cereus* presuntivo em amostras de leite desnatado estéril analisadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia garante que os dados atendam a norma supracitada.

**Palavras-Chave:** Verificação de Método. *Bacillus cereus*. Análise de alimento.

## ABSTRACT

Method verification is a process by which a laboratory seeks to confirm the performance of an already validated method, ensuring that the data obtained meets the specific requirements of the standardized assay. This process is a requirement of NBR ABNT ISO 17025:2017, which is the quality system widely used in testing laboratories. The objective of the present work was to verify whether the method described in POP 65.3240.003, which is based on ISO 7932:2004 – Horizontal method for the presumptive enumeration of *Bacillus cereus* – Colony counting technique at 30°C, meets the parameters for quantitative methods of DOQ-CGCRE-089. This document provides guidance on evaluating the performance of analytical methods aimed at the area of microbiology, which for quantitative methods, evaluates the repeatability and reproducibility parameters. A protocol was drawn up with all the parameters for checking the presumptive *Bacillus cereus* count assay carried out using the surface sowing technique, on mannitol egg yolk agar with polymyxin (MYP). As a matrix, sterile skimmed milk was used, artificially contaminated with certified reference microorganisms (MRC) at a pre-established concentration, with the target microorganism being *Bacillus cereus* MRC ATCC 11778 and the interfering *Staphylococcus aureus* MRC ATCC 6538. Repeatability was achieved by analyzing 10 samples by the same analyst, using culture media, diluents and glassware from the same batch in a short period. Reproducibility was carried out by two analysts, using the same samples, 10 for each analyst, same batches of inputs, and same equipment and on the same day. The performance criteria are described in ISO 7932:2004, which determines for repeatability (r) that the difference in log<sub>10</sub> of the colony forming unit (CFU) counts found should not be greater than 0.29 in 95% of cases analyzed in method verification. For the limit of reproducibility (R), this value must not be greater than 0.42 in 95% of the cases analyzed. The results obtained were 100% of the samples analyzed in repeatability had results equal to or lower than 0.29 and 100% of the samples analyzed in reproducibility had results lower than 0.42. After analyzing the calculations of the performance evaluation acceptance criteria, it is concluded that the method used to count presumptive *Bacillus cereus* in sterile skimmed milk samples analyzed in the Food Sector of the Department of Microbiology guarantees that the data meets the aforementioned standard.

Keywords: Method Verification. *Bacillus cereus*. Food analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Centrifugação das culturas a 7000 rpm por 10 minutos .....	19
Figura 2 - Leitura em fotolorímetro em comprimento de onda de 520 nm .....	19
Figura 3 - Frascos contendo 25 mL skim milk.....	21
Figura 4 - Frascos contendo 225 mL de SSP 0,1%. .....	21
Figura 5 – Amostra sendo homogeneizada em aparelho homogeneizador de amostras.	22
Figura 6 - Semeadura com alça de Drigalski.....	22
Figura 7- Placas contendo os controles: branco, negativo e positivo.....	23
Figura 8 - Placas contendo <i>B. cereus</i> e o interferente.....	23
Tabela 1 - Resultados das contagens da repetibilidade.....	24
Tabela 2 - Resultados das contagens da reprodutibilidade – analist.....	25
Tabela 3 - Resultados das contagens da reprodutibilidade – analista 2.....	25



## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

±	Mais ou Menos
°C	Escala Celsius
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
β	Beta
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro
DICLA	Divisão de Acreditação de Laboratórios
DTHA	Doenças de Transmissão Hídricas e Alimentar
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
IEC	<i>International Electrotechnical Commission.</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> / Organização Internacional de Normalização
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
MQ	Manual da Qualidade
MRC	Material de Referência Certificado (Microrganismo)
MYP	Ágar Manitol Gema de Ovo com Polimixina
NBR	Norma Brasileira
nm	Nanômetro
Ph	Potencial hidrogeniônico
POP	Procedimentos Operacionais Padrão
r	Repetibilidade
R	Reprodutibilidade
RPM	Rotação Por Minuto

<b>SGQ</b>	Sistema de Gestão da Qualidade
<b>SNVS</b>	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
<b>SSP</b>	Solução Salina Peptonada
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UV</b>	Radiação Ultravioleta
<b>VISA</b>	Vigilância Sanitária

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Vigilância Sanitária .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Doenças de transmissão hídrica e alimentar .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 <i>Bacillus cereus</i> .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Contagem de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo (ISO 7932:2004) .....	13
<b>1.4 Sistemas de gestão da qualidade .....</b>	<b>14</b>
1.4.1 ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 .....	14
1.4.2 VERIFICAÇÃO DO MÉTODO.....	15
1.4.2.1 <i>DOQ-CGCRE-089</i> .....	15
<b>1.5 Justificativa .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Amostras.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Preparo dos contaminantes.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Preparo das amostras .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Local e período de realização das análises .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Parâmetros para verificação do método.....</b>	<b>20</b>
<b>3.6 Contagem de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo .....</b>	<b>20</b>
<b>4 RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>28</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>27</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Vigilância Sanitária

O termo Vigilância Sanitária (VISA) é definido pela Lei Orgânica de Saúde n° 8.080/90 como um conjunto de ações que visam eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde, além de ações que buscam intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, produção e circulação de bens, e da prestação de serviços de interesse da saúde. Essas ações incluem o controle de bens de consumo em todas as suas etapas e processos e o controle de prestação de serviços, ambos se relacionando direta ou indiretamente com a saúde (Brasil, 1990).

A VISA trabalha o cuidado em saúde buscando evitar e/ou prevenir ameaças, atuando no âmbito dos produtos, medicamentos, alimentos, meio ambiente e serviços voltados à população, desenvolvendo, regulando, monitorando e fiscalizando, com objetivo de prevenir danos e reduzir os riscos existente e/ou iminentes à saúde. Esta é uma área da saúde que tem por fundamento dar garantia de segurança e de qualidade a esses produtos e serviços. O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) atua na regulação, normatização, controle e fiscalização nessa área, e é composto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz) em nível federal.

## 1.2 Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar

As Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) são causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes patogênicos, toxinas produzidas por patógenos, substâncias químicas ou que contenham na sua composição compostos naturalmente tóxicos, elas representam um desafio significativo para a saúde pública, tanto no Brasil quanto globalmente. Essas doenças acarretam custos econômicos e sociais elevados devido à sua taxa significativa de morbimortalidade, além de gerarem desconfiança entre os consumidores. Entre as principais causas de contaminação alimentar estão a manipulação, transporte e armazenamento inadequados, assim como o risco de contaminação cruzada entre produtos crus e processados (Cortés-Sanchez *et al.*, 2017).

No contexto do risco biológico associado aos alimentos destaca-se *Bacillus cereus* como grupo de bactérias relevante, amplamente distribuído no ambiente. Essas bactérias estão

implicadas em vários surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil (Drewnowska *et al.*, 2020).

### 1.3 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* encontra-se amplamente presente no ambiente e pode contaminar alimentos durante o cultivo, colheita, processamento e armazenamento. Está relacionado a surtos de intoxicação e toxinfecção de origem alimentar, pela capacidade de provocar doenças conhecidas como síndromes emética e diarreica, ganhando destaque quando o assunto é segurança dos alimentos (Rozeau-Szynalski *et al.*, 2020).

Encontrados em diversos tipos de alimentos, os microrganismos de *Bacillus cereus* são bacilos Gram-positivos, aeróbios ou facultativos, com capacidade de esporulação e produção de enterotoxinas potencialmente patogênicas. Além disso são catalase positiva, oxidase variável e produtores de fosfolipases e diversas enzimas extracelulares (Silva *et al.*, 2018). Esta espécie multiplica-se bem na faixa entre 10°C e 50°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento está entre 28°C e 35°C, por se tratar de um microrganismo mesófilo. As células de *B. cereus* desenvolvem-se em alimentos com atividade de água igual ou superior a 0,95 e multiplicam-se na faixa de pH entre 5,0 e 9,3 (Silva *et al.*, 2018). *B. cereus* é conhecido por produzir biofilmes que fornecem uma fonte de contaminação para alimentos durante a fabricação e processamento, os biofilmes são comunidades microbianas baseadas na superfície e são frequentemente descritos como uma estratégia de sobrevivência para o microrganismo no enfrentamento de estresses ambientais adversos, sua matriz contém proteínas, carboidratos e DNA, abordagens físicas e químicas podem ser usadas para romper e quebrar a matriz do biofilme. *B. cereus* forma endósporos, estruturas resistentes a diversos agentes físicos e químicos, como variações de temperatura, desidratação, radiação UV, agentes oxidantes, entre outros. Os endósporos de *B. cereus* são resistentes às condições ambientais extremas, tais como altas temperaturas e desidratação (Mendonça *et al.*, 2017). Quando a condição é favorável, os esporos podem germinar e se multiplicar nos alimentos. Entre as condições que mais favorecem a multiplicação e produção de toxina, se destaca a demora entre o preparo do alimento e seu consumo. Alimentos mantidos à temperatura ambiente por longos períodos, principalmente se mantidos sob refrigeração acima de 4 °C e temperatura de manutenção a quente abaixo de 60 °C tem a chance aumentada para este tipo de contaminação (Silva, 2022). O aquecimento insuficiente, o armazenamento inadequado e a manipulação negligente de alimentos são fatores que favorecem

a multiplicação e a produção de toxinas, as quais são responsáveis pela patogênese e a maioria das manifestações clínicas causadas pela espécie (Oliveira *et al*, 2017).

As doenças alimentares relacionadas a *B. cereus* manifestam-se, classicamente, sob duas formas clínicas: a síndrome diarreica e a síndrome emética. As cepas de *B. cereus* podem produzir uma ou mais enterotoxinas no intestino ou toxina emética no alimento. Assim, é possível que dois tipos de intoxicação alimentar sejam reportados através da ingestão de alimentos contaminados (Oliveira *et al*, 2017).

Na síndrome diarreica a intoxicação alimentar é causada por enterotoxinas complexas, que são produzidas durante o crescimento vegetativo de *B. cereus* no intestino delgado, essas enterotoxinas que causam diarreia são lábeis ao calor, sendo destruídas quando submetidas a temperaturas de 56 °C por 5 minutos, e causam, além de diarreia, sintomas como dor abdominal, e ocorre após a ingestão de mais de 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/g de células de esporos através do alimento. Na maioria dos casos, os sintomas manifestam-se após 12h do consumo do alimento contaminado, com um período de incubação compreendido de 8h a 16 h, e incluem dores abdominais, diarreia aquosa (ou sanguinolenta) e ocasionalmente náuseas e vômitos, os sintomas duram geralmente menos que 48h (Oliveira *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018).

A síndrome emética é uma intoxicação alimentar atribuída a toxina produzida em maior quantidade durante a fase estacionária a partir de componentes nos alimentos. A toxina cereulida, é um polipeptídeo cíclico termoestável sintetizado por uma enzima sintetase de peptídeo não ribossômico e é altamente hidrofóbica, estável ao calor e à proteólise, porém não é antigênica. Devido a essas características a toxina não é inativada pelo suco gástrico nem pelas enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal e permanece viável nos alimentos (Can *et al.*, 2022). Esta toxina liga-se nos receptores do nervo vago aferente (5-HT3) induzindo o quadro emético caracterizado por ocorrência de náuseas e vômito (que podem ser seguidos de diarreia), geralmente 2 h após o consumo do alimento contaminado, com um curto período de incubação de 30 min a 6 h. Ao estimular o nervo vago ou pneumogástrico, inibe a oxidação dos ácidos graxos pelas mitocôndrias hepáticas, provocando lesões reversíveis nas células do fígado. A dose infectante da toxina emética foi estimada em 30 g por kg de peso corporal (Mendonça *et al.*, 2017). A capacidade das células de *B. cereus* em produzir e secretar certas toxinas relaciona-se ao aspecto bioquímico mais importante desse microrganismo. Inúmeras linhagens sintetizam grande variedade de metabólitos extracelulares, incluindo enzimas proteolíticas que podem promover a deterioração dos alimentos. Entre as enzimas que desempenham um papel importante na virulência da espécie, bem como, na deterioração de

diferentes gêneros alimentícios incluem: proteases, fosfolipases, lecitinases, amilases, colagenases e lipases (Frentzel *et al.*, 2018).

A prevenção de contaminação por *Bacillus cereus* requer práticas rigorosas de higiene durante o manuseio, preparo e armazenamento do alimento. Além disso, a implementação de boas práticas de fabricação e o controle adequado de temperatura são fundamentais para minimizar os riscos associados a esse microrganismo. A legislação brasileira, segundo a Instrução Normativa nº 161/2022 que estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos, determina o limite aceitável de contagem de *Bacillus cereus* presuntivo em alimentos (Brasil, 2022).

A análise desse patógeno em alimentos é crucial para garantir a segurança do alimento. Métodos tradicionais, como cultura de isolamento, são frequentemente utilizados em laboratórios de análises de alimentos. Os laboratórios normalmente seguem metodologias internacionalmente reconhecidas na análise microbiológica de alimentos, portanto a verificação da metodologia visa comprovar que o laboratório consegue reproduzir a metodologia adequadamente.

A verificação da metodologia analítica propicia a garantia da qualidade, a precisão e confiabilidade dos resultados obtidos.

### 1.3.1 Contagem de *Bacillus cereus* presuntivo (ISO 7932:2004)

A técnica de contagem de *Bacillus cereus* presuntivo segue a *International Organization for Standardization* (ISO) 7932 de 2004 - Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal – Método horizontal para enumeração presuntiva de *Bacillus cereus* – Técnica de contagem de colônias a 30°C e é aplicável a produtos de consumo humano e animal, e amostras ambientais na área de produção e manipulação de alimentos. A norma ISO estabelece método para a contagem dessa espécie de bacilo, fornecendo diretrizes para garantir uma avaliação precisa e consistente de sua presença em amostras de alimentos.

A norma descreve como proceder com o preparo do meio de cultura, ágar manitol gema de ovo com polimixina (MYP) utilizado para enumeração seletiva e diferencial de *Bacillus cereus* presuntivo a partir de alimentos. Também descreve o procedimento: sobre a inoculação, incubação e contagem de colônias em placas.

As colônias presuntivas são grandes com aspecto fosco, cor-de-rosa, o que indica que a fermentação do manitol não ocorreu. Geralmente a colônia é rodeada por um halo de precipitação da lecitina que indica a produção de lecitinase. Além da identificação presuntiva

de *B.cereus* em ágar MYP, deve ser realizada a seleção de colônias e prova de atividade hemolítica em ágar sangue de carneiro a 30°C por 24 ± 2h. Cepas de *B.cereus* produzem zona de hemólise completa ( $\beta$ ) com diâmetro variável.

A presente norma também informa sobre a precisão da técnica e seus critérios de desempenho determinados para a repetibilidade (r) e reprodutibilidade (R).

#### **1.4 Sistemas de Gestão da Qualidade**

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) é um conjunto de elementos de uma organização que inter-relacionados estabelecem políticas e processos para o planejamento e direção que vise aumentar a qualidade de seu produto (ABNT, 2015). A adoção de normas da qualidade para implementação do SGQ é atualmente uma prática comum e reconhecida como fundamental. A exigência de serviços de calibração e ensaios seguindo padrões internacionais de qualidade alavancou o desenvolvimento de normas internacionais (Rodrigues, 2018).

A documentação da Qualidade é subdividida em vários níveis. O Manual da Qualidade (MQ) onde consta as normas técnicas é considerado documento de primeiro nível, os procedimentos operacionais padrão (POP) de segundo nível e as instruções de trabalho, registros da qualidade são considerados documentos de terceiro nível. No Brasil, as normas técnicas são elaboradas e coordenadas pela ABNT e recebem também a sigla NBR – Norma Brasileira. A ABNT foi declarada o único Fórum Nacional de Normalização, sendo responsável pela gestão do Processo Brasileiro de Padronização e atuando na certificação de produtos desde 1950 (Rodrigues, 2018).

A Organização Internacional de Normalização (ISO/IEC) 17025 é uma das principais normas para gestão da qualidade, sendo esta uma norma específica para laboratórios de ensaio.

##### **1.4.1 ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017**

Esta norma é aplicável a qualquer laboratório que realiza ensaios e especifica os requisitos que devem ser seguidos para implementação de um SGQ. A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 é uma norma que aborda, os requisitos da direção onde há detalhamento dos requisitos organizacionais que a direção deve cumprir para adequar, implementar e manter o sistema de gestão. Aborda também, requisitos técnicos para o desempenho de todo o processo realizado dentro do laboratório, desde o momento do recebimento da amostra até a apresentação



de resultados ao cliente (solicitante), viabilizando uma cadeia de rastreabilidade que garante a confiabilidade dos resultados do laboratório (Santos, 2011).

A implementação desta norma demonstra a competência do laboratório para produzir dados e resultados tecnicamente válidos e confiáveis (Rodrigues *et al.*, 2019).

O fato de o laboratório usar um método normalizado não dispensa a evidência de registros que demonstrem a sua implementação em cumprimento com as características de desempenho do mesmo (INMETRO, 2017). A norma estabelece que é necessário verificar os métodos normalizados, assegurando que o laboratório seja capaz de executá-los de maneira apropriada antes de implantá-los, assegurando que possa alcançar o desempenho requerido e que os registros da verificação devem ser retidos (ABNT, 2017).

No Brasil, a acreditação de laboratórios de acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 é concedida pela Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro (CGCRE), sendo as atividades relacionadas à concessão e à manutenção da acreditação, de responsabilidade da Divisão de Acreditação de Laboratórios (DICLA) (INMETRO, 2017).

#### 1.4.2 Verificação do Método

##### 1.4.2.1 DOQ-CGCRE-089

O documento de Orientação sobre Avaliação de Desempenho de Métodos Analíticos – Microbiologia (DOQ-CGCRE-089 – Revisão 00; 2017) tem como objetivo auxiliar os laboratórios a demonstrarem que um método analítico microbiológico normalizado, nas condições em que é executado, tem as características essenciais para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. O documento é elaborado de acordo com as diretrizes internacionais e contém aplicações sobre os requisitos da acreditação. Ele define a verificação de método como, um processo pelo qual um laboratório busca confirmação de desempenho de um método já validado, garantindo que os dados obtidos atendem os requisitos específicos do ensaio normalizado. Os métodos são divididos em quantitativos e qualitativos, e para cada um são estabelecidos os parâmetros de avaliação.

O método quantitativo consiste em um método de ensaio para o qual a resposta é uma determinada quantidade de microrganismo, medida diretamente ou indiretamente numa certa quantidade de amostra. Para os métodos quantitativos são avaliados os parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade. Onde a repetibilidade é a capacidade de atingir as características de desempenho estabelecidos no método padrão em suas instalações

laboratoriais, utilizando itens idênticos, com o mesmo operador e obtendo resultados já normalizados. E a reprodutibilidade é a capacidade de obter resultados de um mesmo método, com itens iguais, utilizando equipamentos, instalações laboratoriais e operadores diferentes ou apenas operadores diferentes. (INMETRO, 2017).

O DOQ-CGCRE-089 orienta sobre a contaminação artificial das amostras que devem ser realizadas com cultura de referência certificada, tanto para o microrganismo alvo como para os interferentes, atendendo requisitos exigidos da norma ISO/IEC 17025: 2017. (INMETRO, 2017).

### **1.5 Justificativa**

A verificação de método analítico se aplica quando o laboratório utiliza um método já validado para verificar se as condições do laboratório, isto é, insumos, equipamentos e pessoal, são capazes de reproduzir adequadamente a metodologia. A verificação é uma exigência da ABNT NBR ISO 17025:2017 que é o sistema da qualidade mais utilizado em laboratórios de ensaio. Desta forma, este estudo busca comprovar que o laboratório de microbiologia de alimentos do INCQS é capaz de analisar com excelência as amostras de alimentos que recebe e de produzir e controlar a qualidade dos itens de ensaio de proficiência que produzem.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar o desempenho do método analítico de contagem de *Bacillus cereus* presuntivo a partir de alimentos descrito na ISO 7932:2004.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Elaborar o protocolo de verificação de método baseado no DOQ CGECRE 089;
- Realizar os ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade;
- Avaliar os resultados com base nos critérios de aceitação apresentados na ISO 7932:2004;
- Elaborar um relatório final com registros dos resultados e procedimentos experimentais.

### 3 METODOLOGIA

O método consiste na contagem de *Bacillus cereus* presuntivo em amostras de alimentos utilizando a técnica de semeadura em superfície, em duplicata, em meio ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP). Para esta análise, procedeu-se conforme o POP 65.3240.003 (Contagem e identificação presuntiva de *Bacillus cereus* a partir de alimentos) que segue as orientações da ISO 7932:2004 (Método horizontal para enumeração de *Bacillus cereus* presuntivo – técnica de contagem de colônias a 30 °C).

#### 3.1 Amostras

Como matriz foram utilizadas amostras de leite desnatado (*Skim milk* – Difco, ESPANHA) estéril preparadas no setor de meios de cultura do INCQS.

#### 3.2 Preparo dos contaminantes

Foram feitas suspensões de aproximadamente  $9,0 \times 10^6$  UFC/mL de *Bacillus cereus* (ATCC 11778 -MRC) para uso como microrganismo alvo do ensaio, e de aproximadamente  $2,0 \times 10^9$  UFC/mL de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 – MRC) para uso como microrganismo interferente do ensaio.

Para isso uma colônia isolada de cada microrganismo foi semeada em 10 mL de caldo infusão cérebro-coração (Kasvi, FRANÇA) e incubada a  $35 \pm 2$  °C por 24 h. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas (Eppendorf, EUA) a 7000 rpm por 10 minutos e os *pellets* suspensos em solução salina peptonada (SSP) a 0,1% (Figura 1). A leitura foi realizada em fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, INGLATERRA) em comprimento de onda de 520 nm em transmitâncias específicas para cada microrganismo (Figura 2).

Figura 1 – Centrifugação das culturas a 7000 rpm por 10 minutos



Fonte: A autora.

Figura 2 – Leitura em fotocolorímetro em comprimento de onda de 520 nm



Fonte: A autora.

### 3.3 Preparo das amostras

As amostras de leite desnatado estéril contendo 23 mL cada, foram contaminadas artificialmente com 1 mL de uma suspensão de *Bacillus cereus* e 1 mL de uma suspensão de *Staphylococcus aureus* totalizando 25 mL.

### 3.4 Local e período de realização das análises

As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Laboratório de Microbiologia Alimentos e Saneantes do Departamento de Microbiologia do INCQS durante o mês de julho de 2023.

### 3.5 Parâmetros para Verificação do Método

A repetibilidade foi realizada pela análise de 10 amostras pelo mesmo analista, utilizando meios de cultura, diluentes e vidrarias de mesmo lote num curto período.

A reprodutibilidade foi realizada por dois analistas, utilizando as mesmas amostras, 10 para cada analista, mesmos lotes de insumos e mesmos equipamentos no mesmo dia.

### 3.6 Contagem de *Bacillus cereus* presuntivo

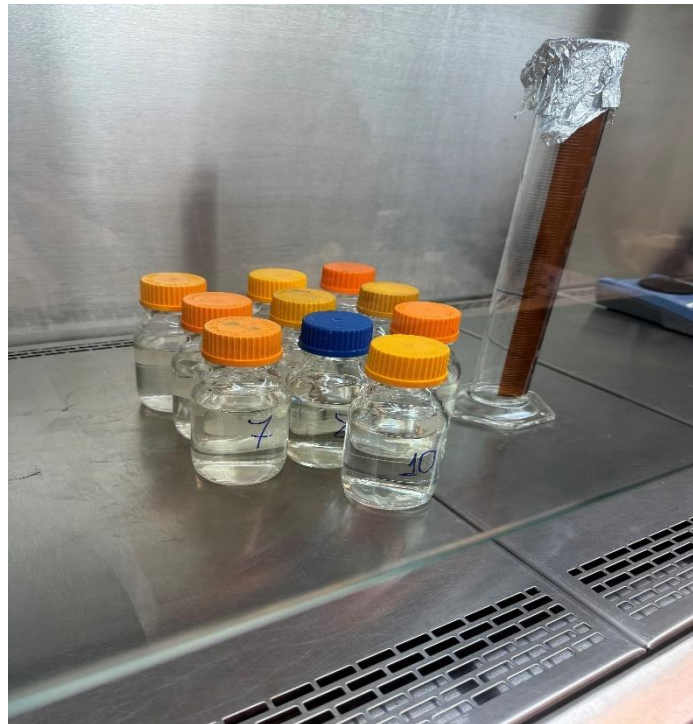
Foram utilizadas 10 amostras de leite desnatado estéril, com 25 mL cada, em cada amostra (Figura 3) foi adicionado volume aproximado de 225 mL de solução salina peptonada (SSP) 0,1% (Figura 4) e homogeneizado por 1 minuto em velocidade 2 em aparelho homogeneizador de amostras (Merck, EUA) (Figura 5). Foi transferido 1 mL a partir do homogenato (diluição  $10^{-1}$ ) para tubo contendo 9 mL de SSP 0,1%, realizando a diluição  $10^{-2}$ . A partir da diluição  $10^{-2}$ , foi transferido 0,1 mL para a superfície de ágar MYP (Himedia, Índia) em duplicata (Figura 6). Após espalhamento do inóculo no meio, as placas foram incubadas invertidas em estufa com temperatura de  $30 \pm 1,0$  °C por  $24 \pm 2$  horas, juntamente com uma placa contendo apenas o ágar MYP (Branco) (Figura 7), uma placa semeada com *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 – MRC) (Figura 7) e outra placa semeada com *Bacillus cereus* (ATCC 11778 – MRC) (Figura 7). Foi realizada a contagem do microrganismo alvo para verificar a repetibilidade e reprodutibilidade do método (Figura 8).

Figura 3 - Frascos contendo 25 mL *skim milk*



Fonte: A autora.

Figura 4 – Frascos contendo 225 mL de SSP 0,1%



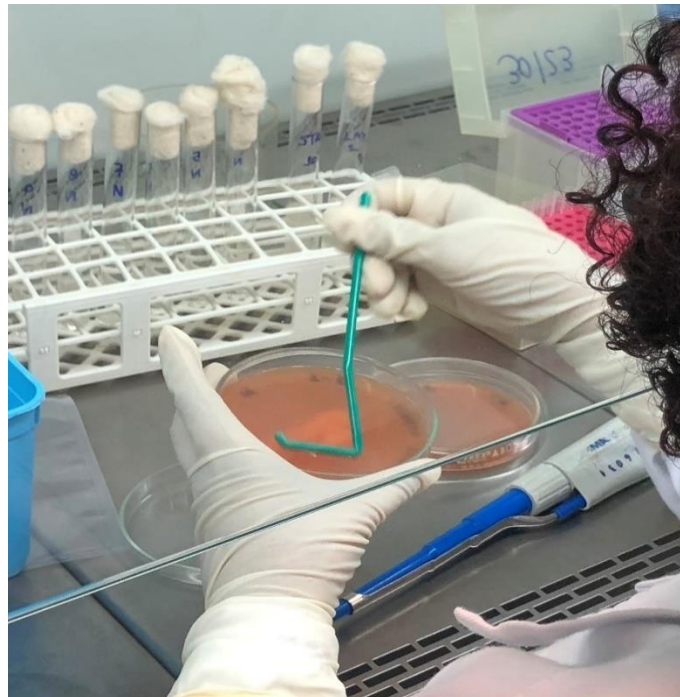
Fonte: A autora.

Figura 5 – Amostra sendo homogeneizada em aparelho homogeneizador de amostras



Fonte: A autora.

Figura 6 – Semeadura com alça de Drigalski



Fonte: A autora.

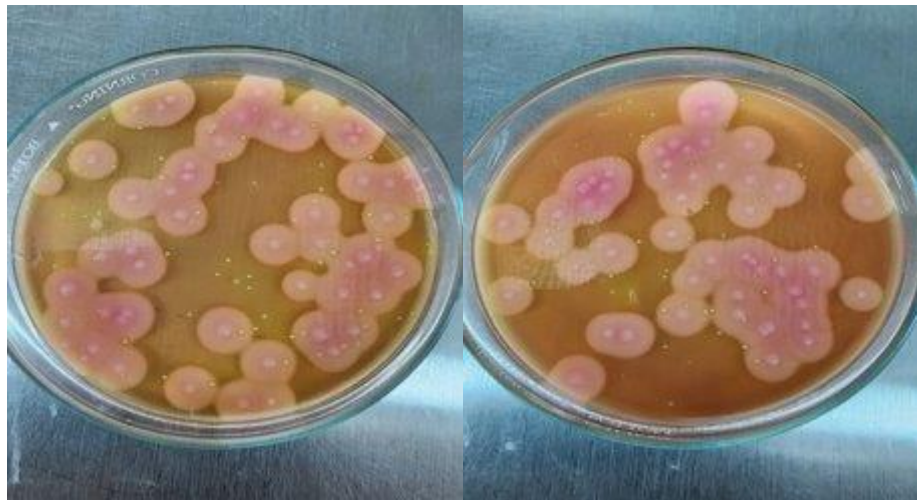


Figura 7- Placas contendo os controles: branco, negativo e positivo



Fonte: A autora.

Figura 8 – Placas contendo *B. cereus* e o interferente



Fonte: <sup>A</sup> autora.

Não foi necessário realizar prova de atividade hemolítica em ágar sangue de carneiro, pois foram utilizados Materiais de Referência Certificada (MRC).

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Laboratórios analíticos que apresentam um sistema da qualidade implementado, devem ter participação em programas de ensaio de proficiência, e realizar a verificação dos métodos analíticos para demonstrar que o desempenho apresenta resultados satisfatórios. As análises laboratoriais são consideradas medidas de referência ao atendimento de padrões, são através destes resultados que se tem todo um entendimento da qualidade apresentada nos produtos alimentícios, garantindo que o resultado que consta no laudo da amostra analisada seja preciso e confiável. Os parâmetros utilizados para avaliação de desempenho de métodos quantitativos são: repetibilidade e reprodutibilidade, que neste estudo nos forneceu os seguintes dados:

### REPETIBILIDADE

Foram utilizados os valores das 10 contagens realizadas em duplicata, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo procedimento, nas mesmas condições em curto período.

Segundo a ISO 7932:2004, a diferença em  $\log_{10}$  isso entre os valores de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), não deve ser superior a 0,29 em 95% dos casos analisados (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados das contagens da repetibilidade

Teste n°	Contagem placa 1 (a)	Contagem placa 2 (b)	Log a	Log b	Média dos Logs	(Log a – Log b)
1	117	100	2,07	2,00	2,03	0,06
2	123	81	2,09	1,91	2,00	0,18
3	137	82	2,14	1,91	2,03	0,22
4	88	71	1,94	1,85	1,90	0,09
5	94	71	1,97	1,85	1,91	0,12
6	102	91	2,01	1,96	1,98	0,04
7	83	75	1,92	1,88	1,90	0,04
8	103	57	2,201	1,76	1,88	0,25
9	90	57	1,95	1,76	1,86	0,19
10	101	51	2,00	1,71	1,86	0,29

Fonte: INCQS, 2023.

Na tabela 1, podemos observar que as dez amostras analisadas todas apresentaram resultado da diferença em  $\log_{10}$  igual ou inferior a 0,29 demonstrando que a execução da técnica atende aos parâmetros exigidos no documento.

## REPRODUTIBILIDADE

Os resultados do teste são obtidos com o mesmo método e mesmo lote de matriz, meio de cultura, diluente e vidrarias com diferentes operadores utilizando os mesmos equipamentos.

A norma ISO 7932:2004 determina que a diferença em  $\log_{10}$  entre os valores de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), não deve ser superior a 0,42 em 95% dos casos analisados (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Resultados das contagens da reprodutibilidade – analista

Teste n°	Contagem placa 1 (a)	Contagem placa 2 (b)	Log a	Log b	(Log a – Log b)
1	73	71	1,86	1,85	0,01
2	85	75	1,93	1,88	0,05
3	119	93	2,08	1,97	0,11
4	119	93	2,08	1,97	0,11
5	123	85	2,09	1,93	0,16
6	79	78	1,90	1,89	0,01
7	98	42	1,99	1,62	0,37
8	98	78	1,99	1,89	0,10
9	113	83	2,06	1,92	0,14
10	99	81	2,00	1,91	0,09

Fonte: INCQS, 2023.

Tabela 3 - Resultados das contagens da reprodutibilidade – analista 2

Teste n°	Contagem placa 1 (a)	Contagem placa 2 (b)	Log a	Log b	(Log a – Log b)
1	83	49	1,92	1,69	0,23
2	67	64	1,83	1,81	0,02
3	74	69	1,87	1,84	0,03
4	97	81	1,99	1,91	0,08
5	86	67	1,93	1,83	0,11
6	100	76	2,00	1,88	0,12
7	74	59	1,87	1,77	0,10
8	70	63	1,90	1,80	0,10
9	73	68	1,86	1,83	0,03
10	84	45	1,92	1,65	0,37

Fonte: INCQS, 2023.

Nas tabelas 2 e 3, podemos observar que todas as dez amostras analisadas por diferentes analistas, apresentaram resultado de  $\log_{10}$  menor que 0,42 demonstrando que a execução da técnica atende aos parâmetros exigidos no documento.

Os dados obtidos se equivalem aos encontrados por Silva Rodrigues (2021) que ao executar a validação secundária do método de “Contagem de *Staphylococcus spp.* E *Staphylococcus* coagulase positiva de acordo com a Norma Portuguesa 4343:1998 – Qualidade da água: Pesquisa e Quantificação de Estafilococos”, utilizou os parâmetros de precisão e obteve valores satisfatórios, de acordo com as normas e com os critérios do laboratório.

Ferreira (2022) ao analisar os dados de verificação do método descrito na ISO 21527-2:2008 “Microbiologia de Alimentos para consumo humano e animal – Método horizontal para enumeração de leveduras e bolores – Parte 2: Técnica de contagem de colônias em produtos com atividade de água menor ou igual a 0,95” obteve resultado satisfatório no parâmetro de precisão intermediária nos cálculos que utilizou para avaliar os valores de repetibilidade e reprodutibilidade.

Apesar de Faustino (2020) ter efetuado uma validação do método qualitativo em seu estudo de “Validação de pesquisa de *Salmonella* em 375g em amostras de várias matrizes pela ISO 6579-1 e VIDAS SPT” encontrou dados satisfatórios ao analisar dados de exatidão, esta exatidão foi demonstrada com base nos resultados dos ensaios de comparação interlaboratorial.

Todos os estudos citados acima utilizaram mais de 30 amostras de diferentes matrizes alimentares em seus testes.

## 5 CONCLUSÃO

Após a elaboração do protocolo e da execução das análises, os resultados com base nos cálculos dos critérios de aceitação da avaliação de desempenho apresentados na ISO 7932:2004, foram considerados adequados para a contagem de *Bacillus cereus* presuntivo em amostras de leite desnatado estéril analisadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia. Todos os dados referentes a estudo, incluindo os registros das análises, insumos e resultados foram registrados em um relatório final.

## REFERÊNCIAS

- ABNT. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio de calibração. Rio de Janeiro, 2017.
- ABNT. **NBR ISO 9000**: sistemas de gestão da qualidade – fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa no 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/28iotecnol-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>. Acesso em: 20 ago. 2023.
- BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**: seção I, pt. 1, p. 18055-59, 20 set. 1990.
- CAN, Hayriye Yeşim *et al.* Propriedades psicotróficas, características toxigênicas e perfis PFGE de *Bacillus cereus* isolado de diferentes alimentos e especiarias. **Ciencia rural**, v. 52, n. 4, p. 14, 2022.
- CORTÉS-SÁNCHEZ, A. D. J.; DÍAZ-RAMÍREZ, M.; SALGADO-CRUZ M. D. L. P. *Bacillus cereus*: Alimentos, salud y 28iotecnología. **Agroproductividad**, v.10, n. 10, p. 3-9, 2017.
- OLIVEIRA, Edilaine Barcelos de *et al.* Causada pelo *Bacillus cereus*: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 268/269, 2017.
- MASCARENHAS, Luís Renato dos Santos. **Fatores de virulência de *Bacillus cereus* sensu stricto isolados de alimentos**. 2018. 85 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Belo Horizonte, 2018.
- DREWNOWSKA, J. M. *et al.* Potencial enterotoxicidade de isolados filogeneticamente diversos de *Bacillus cereus* sensu lato de diferentes localizações geográficas. **Microbiologia aplicada e ambiental**, v. 86, n. 11, p. e03032-19, 2020.
- FAUSTINO, Ana Sofia Mendes. **Validação de pesquisa de *Salmonella* em 375g em amostras de várias matrizes pela ISO 6579-1 e VIDAS SPT**. 2020. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, 2020.
- FERREIRA, Catarina Alexandra Mendes. **Validação secundária ao método ISO 21527-2: 2008 Auditoria ao método ISO 10718: 2015**. 2022. 47 f. Dissertação (Mestre em Bioquímica em Saúde) – Instituto Politécnico do Porto, Escola Superior de Saúde, Porto, 2022.

FRENTZEL, Hendrik *et al.* Características filogenéticas e toxinogênicas de membros do grupo *Bacillus cereus* isolados de especiarias e ervas. **Controle Alimentar**, v. 83, p. 90-98, 2018.

INMETRO (Brasil). **DOQ-CGCRE-008**: orientação sobre avaliação de desempenho de métodos analíticos – microbiologia. Rio de Janeiro, 2017.

INCQS (Brasil). **POP 65.3240.003**: contagem e identificação presuntiva de *bacillus cereus* a partir de alimentos. *In*: MANUAL da qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

INCQS (Brasil). **Protocolo de avaliação de desempenho de método 01/2023**: ensaio de contagem de *bacillus cereus* presuntivo a partir de alimentos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, [2023].

INCQS (Brasil). **Relatório de avaliação de desempenho de método 01/2023**: ensaio de contagem de *Bacillus cereus* presuntivo a partir de alimentos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, [2023].

ISO. **ISO 7932**: microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of presumptive *bacillus cereus* – colony count technique at 30 °C. Switzerland: ISO, 2004. 13 p.

MENDONÇA, Janaína Magdalena *et al.* **Intervenção didática sobre intoxicação alimentar em ambiente escolar**: conhecimentos prévios e cuidados com os alimentos. 2017. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Ensino em Biociências e Saúde) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

MOURA, Vanessa Carvalho Pereira de. **Desempenho das agências transfusionais da hemorrede pública do Distrito Federal a partir da implementação da auditoria interna da qualidade**. 2022. 84 f. Dissertação (Mestrado em Políticas Públicas em Saúde) - Escola Fiocruz de Governo, Fundação Oswaldo Cruz, Brasília, 2022.

RODRIGUES, Bianca Marlene da Silva. Validação secundária do método de contagem de *Staphylococcus* spp. E *Staphylococcus* coagulase positiva e auditoria interna: Relatório de Estágio de Mestrado. 2021.

RODRIGUES, Izabel dos Santos. **Utilização de ferramentas de gestão na implantação de um sistema de gestão da qualidade em uma coleção microbiológica**. 2018. 147 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

RODRIGUES, Nathalia Pamela *et al.* **Proposta de implementação de um sistema de gestão da qualidade para acreditação pela abnt nbr iso/iec 17025**: 2017 para o laboratório de qualidade da bioengenharia do HCU-UFU. 2019. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

ROUZEAU-SZYNALSKI, Katia *et al.* Por que levar a sério o emético *Bacillus cereus*: produção de cereulide e desafios industriais. **Microbiologia de alimentos**, v. 85, p. 103279, 2020.

SANTOS, L. O. **Acreditação de laboratórios de ensaio de acordo com os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SILVA, Daniel Almeida Cozendey da. **Modelagem preditiva do crescimento de *Bacillus cereus* em refeições coletivas**. 2022. 71 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

SILVA, Juliana Fonseca Moreira *et al.* Contaminação por *Bacillus cereus* e os riscos de intoxicação alimentar. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 5, n. 2, p. 30-40, 2018.

SOUZA, Hugo Vieira Lucena de. Normas ISO para Qualidade de Processos de Software. *In*: VASCONCELOS, Alexandre Marcos Lins de; MOURA, Hermano Perrelli de. **Software: Processo, Qualidade e Gestão**. Recife: CIn-UFPE, 2012. Cap. 9, p. 26-29.



## APÊNDICE

Quadro 1 – Equipamentos utilizados no ensaio de contagem de *Bacillus cereus* em amostras de leite desnatado

<b>Descrição</b>	<b>Marca / Modelo</b>
Cabine de segurança biológica	VECO / Bio Seg 18
Estufa BOD a 30°C	FANEM / 347 CD
Micropipeta P 200	RAININ / 100 – 1000 µL
Micropipeta P 1000	RAININ / 20 – 200 µL
<i>B. cereus</i> MRC ATCC 11778	Microbiologics
<i>S. aureus</i> MRC ATCC 6538	Microbiologics
Homogeneizador	MERCK / ESH

Quadro 2 – Soluções e meios de cultura utilizados no ensaio de contagem de *Bacillus cereus* em amostras de leite desnatado

<b>Descrição</b>	<b>Marca</b>
Solução salina peptonada 0,1%	Formulado
Ágar Manitol gema de ovo polimixina (MYP)	Himedia

Quadro 3 – Vidrarias e instrumentos utilizados no ensaio de contagem de *Bacillus cereus* em amostras de leite desnatado

<b>Descrição</b>
Alça bacteriológica
Alça de Drigalski
Tubo de ensaio 15 x160mm
Proveta 500 mL
Frasco 250 mL
Saco plástico para homogeneizador