

**LIGA DE ENSINO DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE NATALENSE PARA O DESENVOLVIMENTO
DO RIO GRANDE DO NORTE
CURSO DE NUTRIÇÃO**

JÉSSICA PATRÍCIA BATISTA BEZERRA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM FARINHAS DE MILHO PRÉ-COZIDAS
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE NATAL – RN**

NATAL/RN

2011

JÉSSICA PATRÍCIA BATISTA BEZERRA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM FARINHAS DE MILHO PRÉ-COZIDAS
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE NATAL – RN**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte, como requisito final para a obtenção do título de bacharel em Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dra Cláudia Martins de Oliveira

NATAL/RN

2011

JÉSSICA PATRÍCIA BATISTA BEZERRA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM FARINHAS DE MILHO PRÉ-COZIDAS
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE NATAL – RN**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Curso de Nutrição da Faculdade
Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte, como requisito final
para obtenção do título de bacharel em Nutrição.

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra Cláudia Martins de Oliveira
Orientador

Membro

Membro

Catálogo na Publicação – Biblioteca da FARN
Setor de Processos Técnicos

Bezerra, Jéssica Patrícia Batista

Análise Microbiológica em Farinhas de Milho Pré-cozidas
Comercializadas

no Município de Natal – RN/Jéssica Patrícia Batista Bezerra. – Natal: FARN,
2011.

35 f.

Orientador: Cláudia Martins de Oliveira (Dra.)

Monografia (Bacharelado em Nutrição) – Faculdade Natalense para o
Desenvolvimento do Rio Grande do Norte.

1. Análise Microbiológica – Monografia. 2. Farinha de Milho –
Monografia. 3. Natal – Monografia. I. Título

Este trabalho é dedicado, em especial, aos meus pais João Mozart de Melo Bezerra e Erivalda Batista Bezerra, a minha filha Hanna Gabriela Bezerra de Macêdo Tinôco e ao meu esposo Marcos de Macêdo Tinôco, verdadeiras razões da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu único salvador, que me permitiu a conclusão deste trabalho, sendo o principal responsável por todas as minhas conquistas.

Agradeço aos meus queridos pais, **Erivalda Batista Bezerra** e **João Mozart de Melo Bezerra**, exemplos de caráter, honestidade e união. De vocês recebi o dom mais precioso que poderiam me dar: o amor. Não contentes, preencheram-me de alegrias, carinho e compreensão. Abriram as portas do meu futuro, iluminando o meu caminho e dando condições para que eu pudesse continuar nesta longa caminhada profissional. Trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus, não medindo esforços para que eu obtivesse sucesso em mais uma etapa da minha vida. E não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, principalmente nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis, e o estudo um fardo pesado demais. Simplesmente, **OBRIGADA**.

A minha eterna gratidão e respeito.

A minha amada filha **Hanna Gabriela**, por compreender minha ausência durante todo o curso, Amo-te.

Agradeço ao meu esposo **Marcos Tinôco**, pelo apoio, companheirismo e constante incentivo nestes últimos anos e principalmente pela paciência e compreensão nos momentos em que eu estive ausente durante a elaboração deste trabalho. Obrigada pela demonstração constante de carinho e respeito, mesmo nas horas mais difíceis, durante esta longa caminhada;

Aos meus irmãos **Silvio Erizart**, **Luzia Eugênia** e **João Thiago** que foram essenciais na transmissão de palavras de incentivo e de apoio;

Ao meu grupo de estudos (Dayanna, Edilza, Mayra e Sara) que sempre me motivou a continuar estudando, me ajudando no que era possível, ficará a lembrança dos momentos felizes. A vocês o meu muito **obrigado**.

A minha amiga em especial **Edilza Silva do Nascimento**, exemplo de uma amizade verdadeira, que nasceu desde o primeiro dia de aula. A esta amiga que sempre demonstrou ternura, sabedoria divina, compreensão e muita paciência, e que esteve sempre presente não só nos momentos de alegria, mas também nas horas em que mais precisei de um ombro amigo, o meu especial agradecimento, pois sem você este trabalho se tornaria ainda mais difícil.

“Muito obrigada, de coração”.

A todos os docentes do curso de Nutrição pela atenção, paciência e pela transmissão dos conhecimentos necessários para a minha formação e desenvolvimento pessoal e profissional;

A Professora **Monique Silveira Rosa**, exemplo de dedicação, amor à arte de ensinar; pelo incentivo a busca de conhecimentos científicos através da pesquisa; pelos ensinamentos criteriosos transmitidos durante o curso e pelos benefícios que isto me proporcionou;

A minha orientadora, Professora Dra. **Cláudia Martins de Oliveira**, pela confiança, valorosa contribuição e incentivo nas orientações durante a realização deste trabalho, além dos ensinamentos que me foram passados durante todo o período, os quais me fizeram crescer profissionalmente. Obrigada pela dedicação, paciência, amizade e competente orientação, que mesmo neste momento difícil de sua vida, sempre estiveram presentes.

À todas as pessoas que de alguma forma participaram e colaboraram na realização deste trabalho, Muito obrigada.

“Para atingirmos nossos objetivos, precisamos de um esforço interior conjunto: devemos esquadrihar nosso coração, determinar um curso a seguir e, então, depender de Deus e estar dispostas a deixá-lo guiar-nos, um passo de cada vez.”.

Sheila West

RESUMO

O modelo alimentar de um povo faz parte de seu patrimônio cultural. Em cada país, as práticas alimentares são ricas em tradição e variam segundo os níveis sociais, as regiões, entre outros fatores. Os alimentos representam a ligação mais primitiva entre natureza e cultura, fazendo parte da raiz que liga um povo à sua terra. O milho (*Zea mays L*), cereal que pertence à família *Gramineae*, tem grande representação na culinária da cultura Nordestina, bastante consumido *in natura* ou na forma de produtos industrializados, tem marcante importância nutricional devido o alto teor de amido, além dos lipídeos, proteínas e vitaminas encontradas nos grãos. A farinha de milho pré-cozida está frequentemente na mesa do consumidor, sendo um dos principais produtos do milho consumido pela população de baixa renda. No entanto os produtos a base de milho, são suscetíveis à contaminação por bolores e leveduras, por diversos fatores que podem afetar o crescimento de fungos em grãos de milho, tais como: teor de umidade dos grãos, condição física e sanitária dos grãos, nível de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento anterior, insetos e ácaros. Essa contaminação dos grãos por fungos pode ocorrer ainda no campo ou durante o armazenamento do produto. Devido o tradicional consumo destes produtos oriundos do milho faz-se necessário avaliar se os processos na produção desses gêneros tão comum em nosso cotidiano estão sendo realizados dentro das condições higiênico-sanitárias. Esta pesquisa teve como objetivo investigar os microrganismos que possivelmente possam contaminar as farinhas de milho pré-cozidas comercializadas em supermercados do município de Natal. Foram analisadas em cinco etapas, 20 amostras de quatro marcas diferentes (A, B, C e D) de farinha de milho pré-cozida. As amostras foram coletadas na qualidade de consumidor; foi realizada a contagem padrão em placa de bolores e leveduras através da semeadura em superfície; o Número mais Provável de *coliformes* a 45°C usando a técnica dos tubos múltiplos e pesquisa de *salmonella sp.* As amostras foram preparadas de acordo com as normas do ICMSF (1978). Das análises realizadas não foram confirmados resultados positivos para *coliformes* a 45°C e para pesquisa de *salmonella sp.* Entretanto para bolores e leveduras foram detectados resultados positivos para 60% das amostras analisadas. Diante dos resultados obtidos pode-se observar que o processo utilizado na produção das farinhas de milho pré-cozidas pode ser satisfatório quanto à ausência de contaminação fecal e microrganismos patogênicos. No entanto, devido à comprovação na presença de bolores e leveduras, possivelmente as condições no armazenamento apresentam-se insatisfatórias, necessitando de um maior controle, desta forma não apresentando segurança alimentar para o consumidor, representando risco à saúde da população consumidora deste alimento potencialmente tradicional na região. Portanto, sugerem-se maiores cuidados no armazenamento dos alimentos regionais, mesmo assim é importante a utilização das Boas Práticas de Fabricação desde o início do processamento pelos fabricantes até a conservação e distribuição final dos produtos pelos comerciantes, de forma que os mesmos não se constituam em riscos para a saúde da população.

Palavras Chave: Análise Microbiológica. Farinha de Milho. Microrganismos.

ABSTRACT

The model food of a people is part of their cultural heritage. In each country, feeding practices are rich in tradition and vary according to social classes, regions, and other factors. Foods are more primitive connection between nature and culture, as part of a root that connects people to their land. Corn (*Zea mays* L.) grain belonging to the family Gramineae, have great representation in the culinary culture of the Northeast, widely consumed fresh or as processed products, has remarkable nutritional importance because of the high starch content, in addition to lipids, proteins and vitamins found in grains. Corn flour is often pre-cooked in the consumer's table, one of the main products of the corn consumed by low-income population. However, the products made from corn, are susceptible to contamination by fungi and yeasts, by several factors that can affect the growth of fungi in corn, such as grain moisture content, physical condition and health of the grain level inoculation of the fungus, oxygen content and storage above, insects and mites. This contamination of grain by fungi can occur even in the field or during storage of the product. Because the traditional consumption of these products from corn is necessary to evaluate whether the production of these genres so common in our daily lives are being conducted within the sanitary conditions. This research aimed to investigate the microorganisms that could possibly contaminate the corn flour precooked sold in supermarkets in the city of Natal. Were analyzed in five steps, 20 samples of four different brands (A, B, C and D) of corn flour precooked. Samples were collected as a consumer; counts were performed in standard plate molds and yeasts by sowing surface, the most probable number of coliforms at 45 ° C using the technique of multiple pipes and salmonella sp. The samples were prepared in accordance with the rules of the ICMSF (1978). Analyzes the results were not confirmed positive for coliforms at 45 ° C and for salmonella sp. However for yeasts and molds were found positive results for 60% of samples. Results obtained can be seen that the process used in the production of maize flour precooked may be suitable for the absence of fecal contamination and pathogens. However, due to evidence the presence of yeasts and molds, possibly storage conditions have to be unsatisfactory, requiring more control, thus showing no food safety for consumers, representing a risk to health of consumers of traditional food potentially in the region. Therefore, we suggest greater care in regional food storage, it's still important to use the Good Manufacturing Practices since the beginning of processing by manufacturers to the conservation and distribution of final products by traders, so that they do not constitute risks to the health of the population.

Keywords: Microbiological Analysis. Corn Flour. Micro-organisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Fluxograma da coleta das amostras para as análises microbiológicas em farinha de milho pré-cozida	20
FIGURA 2 – Fluxograma da Determinação do Número Mais Provável de <i>Coliformes</i> a 45°C em amostras de farinha de milho pré-cozida.....	22
FIGURA 3 – Fluxograma da Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> em amostras de farinha de milho pré-cozida	25
FIGURA 4 – Fluxograma da pesquisa de bolores e leveduras em amostras de farinha de milho pré-cozida	27
FIGURA 5 – Distribuição percentual de <i>Coliformes</i> e <i>Salmonella sp</i> nas amostras analisadas em farinhas de milho pré-cozidas no município de Natal - RN	28
FIGURA 6 – Distribuição percentual de bolores e leveduras nas amostras analisadas em farinhas de milho pré-cozidas no município de Natal – RN	29
QUADRO 1 – Contaminação de bolores e leveduras nas 20 amostras de farinha de milho pré-cozida comercializadas no município de Natal – RN	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 GERAL	14
2.2 ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 CULINÁRIA NORDESTINA	15
3.2 FARINHA DE MILHO PRÉ-COZIDA	15
3.3 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS PARA FARINÁCEOS	16
3.3.1 <i>Coliformes a 45°C</i>	16
3.3.2 <i>Salmonella sp</i>	17
3.3.3 Bolores e leveduras	17
4 METODOLOGIA	19
4.1 TIPO DA PESQUISA	19
4.2 AMOSTRA	19
4.3 MÉTODOS	20
4.3.1 Preparo da Amostra	20
4.3.2 Análises Realizadas	21
4.3.2.1 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de <i>Coliformes a 45°C</i>	21
4.3.2.1.1 Prova presuntiva	21
4.3.2.1.2 Prova confirmatória	21
4.3.2.2 Pesquisa da <i>Salmonella sp</i>	22
4.3.2.2.1 Pré-enriquecimento	22
4.3.2.2.2 Enriquecimento seletivo	23
4.3.2.2.3 Isolamento	23
4.3.2.2.4 Triagem	23
4.3.2.2.5 Provas de identificação	24
4.3.2.3 Contagem de bolores e leveduras	26
4.3.2.3.1 Inoculação	26
4.3.2.3.2 Incubação	26
4.3.2.3.3 Contagem das colônias e cálculo dos resultados	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O modelo alimentar de um povo faz parte de seu patrimônio cultural. Em cada país, as práticas alimentares são ricas em tradição e variam segundo os níveis sociais, as regiões, entre outros fatores. Os alimentos representam a ligação mais primitiva entre natureza e cultura, fazendo parte da raiz que liga um povo à sua terra. (BOTELHO, 2005).

Os produtos regionais, que podem ser apresentados sob a forma de artesanato ou produtos alimentares, são a expressão da cultura, tradições, valores modos de vida de uma região (VALE DO LIMA, 2005).

As práticas alimentares no Rio Grande do Norte distinguem-se intraregionalmente, apesar de ser evidente a preponderância dos hábitos oriundos do sertão nordestino sobre a culinária tradicional, especialmente aquela apresentada na cidade de Natal. (FISBERG; WEHBA; COZZOLINO, 2002). Já na região da zona da mata os produtos mais consumidos são a farinha de mandioca, rapadura, milho e seus derivados.

Os produtos derivados de milho são bastante apreciados na culinária nordestina, tendo participação efetiva como componentes básicos na dieta alimentar das camadas mais pobres da população (MELO-FILHO; RICHETTI, 1997).

Atualmente, a indústria caseira de fabricação artesanal tem sido destacada como uma alternativa promissora para melhorar a renda das famílias no meio rural. (NUNES et. al, 2000, apud ALMEIDA et al., 2009).

Nas últimas décadas, vem aumentando as doenças transmitidas por alimentos que estão relacionadas a vários fatores, tais como o desenvolvimento econômico, o aumento do comércio de alimentos, a urbanização. A garantia da qualidade assegura que o produto está em boas condições, uma manipulação inadequada do alimento pode levar a uma contaminação, através de perigos químicos, físicos ou biológicos, provocando riscos à saúde humana (ZAFFARI et al., 2007). Por isso, segundo Germano; Germano (2008), o treinamento de manipuladores é um procedimento de maior relevância para a prevenção da contaminação de alimentos durante as diferentes fases de preparo.

A identificação do nível de contaminação, assim como análise físico-química de um determinado alimento é de extrema importância para que se estabeleçam

recomendações e aplicações de medidas preventivas e de controle para garantir uma segurança alimentar, aumentando a vida de prateleira dos alimentos, diminuindo o recolhimento de alimentos do fabricante e, conseqüentemente, diminuindo o risco de toxinfecções. (NASCIMENTO; NASCIMENTO, 2008).

O aumento do consumo de alimentos artesanais pela população vem crescendo muito nos últimos anos, isso se deve ao fato das indústrias caseiras ter se expandido por todas as regiões, com isso o surgimento dessas indústrias, onde a manipulação e os cuidados com a higiene não são controlados, colocam em risco a saúde dos que consomem esse tipo de alimento. A importância de uma análise microbiológica se torna de extrema importância, tendo em vista que nem todas as indústrias são registradas, o que dificulta saber o real número dessas pequenas empresas.

Desta forma, a realização deste trabalho tem como objetivo investigar os microrganismos que possivelmente possam contaminar um desses alimentos que é a farinha de milho pré-cozida, alertando a população sobre os perigos do consumo desse alimento tão comum em nosso dia a dia, justificando a elaboração do presente estudo tornando relevante a sua execução.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a qualidade microbiológica de farinhas de milho pré-cozidas comercializadas no município de Natal-RN.

2.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a presença de *Coliformes* a 45°C em farinha de milho pré-cozida;
- Verificar a presença de *Salmonella sp* em farinha de milho pré-cozida;
- Verificar a presença de bolores e leveduras em farinha de milho pré-cozida.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CULINÁRIA NORDESTINA

A cozinha da região nordestina apresenta características resultantes da junção de hábitos alimentares próprios de portugueses, índios e africanos. No entanto, é uma cozinha na qual há abundância de ingredientes provenientes desses três povos.

A cozinha do sertanejo apresenta mais influência da colonial portuguesa e mais isenta da influência índia e negra. O consumo de mandioca principalmente na forma de farinha, inhame e outras raízes, feijão, carne seca e de sol são bastante comum. (FAGLIARI, 2005).

No Rio Grande do Norte, em decorrência da produção extensiva de gado, a dificuldade de transporte de animais vivos até os mercados consumidores levou ao surgimento da carne seca, hoje consumida em todo o Brasil (FAGLIARI, 2005).

3.2 FARINHA DE MILHO PRÉ-COZIDA

O milho (*Zea mays L*), cereal que pertence à família *Gramineae*, consumido *in natura* ou na forma de produtos industrializados, tem grande contribuição na alimentação humana e animal, por suas características nutricionais como fonte energética em função do alto teor de amido, lipídios, proteínas e vitaminas encontradas nos grãos (ARAÚJO et al,2009; RIBEIRO et al,2003). Os produtos derivados do milho como farinha de milho, creme de milho, fubá (farinha de milho), flocos de milho, canjiquinha, xerém, dentre outros, estão potencialmente frequentes na mesa dos brasileiros principalmente daqueles que ocupam a camada mais baixa da sociedade por apresentar baixo custo no mercado (SANTOS et al.,2009; PAES, 2006). São muito utilizados e bastante apreciados na culinária brasileira, tendo participação efetiva como componente de várias preparações como cuscuz, polenta, pamonha, pipoca e outros.

No entanto os produtos a base de milho, são suscetíveis à contaminação por bolores e leveduras. São vários os fatores que afetam o crescimento de fungos, em grãos de milho, tais como, teor de umidade dos grãos, condição física e sanitária dos grãos, nível de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento anterior, insetos e ácaros. Essa contaminação dos grãos por fungos pode ocorrer ainda no campo ou durante o armazenamento do produto (SANTOS et al., 2009). Segundo Santos et al. (2009) estes produtos podem ser contaminados por coliformes totais e termo tolerantes.

Desta forma o conhecimento de como a qualidade sanitária da matéria-prima afeta a qualidade dos subprodutos é muito importante para a indústria e para o consumidor (SANTOS et al., 2009).

3.3 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS PARA FARINÁCEOS

3.3.1 *Coliformes* a 45°C

Os coliformes são bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes. São encontrados no meio-ambiente. São conhecidos também como grupo coli-aerogenes (FORSYTHE, 2002).

Os coliformes fecais são bactérias pertencentes aos coliformes, porem utilizam a lactose a 44,5° C no meio de cultura EC com produção de gás. Este grupo também é denominado de coliformes termotolerantes ou *coliformes* a 45° C (SILVA JR, 2005).

Os critérios utilizados para identificação são a produção de gás decorrente da glicose e a fermentação da lactose até a produção de ácido e gás em um período. Devido o fato dos coliformes ser destruídos com facilidade pelo calor, sua contagem pode ser útil em testes de contaminações pós-processamento (FORSYTHE, 2002).

3.3.2 *Salmonella sp.*

A *Salmonella* é gram-negativa, anaeróbia facultativa, não formam esporos e têm forma de bastonetes curtos. Vários alimentos contaminados são associados à salmoneloses, incluindo carne bovina, aves, ovos, leite e derivados e peixes (FORSYTHE, 2002).

A contaminação do alimento ocorre devido ao controle de inadequado de temperatura, praticas de manipulação ou por contaminação cruzada de alimentos crus com alimentos processados. Os principais sintomas são: diarreia, náusea, dor abdominal, febre, vômitos (FORSYTHE, 2002).

3.3.3 Bolores e leveduras

Os bolores são extremamente versáteis, a maioria das espécies capaz de assimilar qualquer fonte de carbono derivado de alimentos. As leveduras são mais exigentes do que os bolores. Muitas são incapazes de assimilar nitrato e carboidratos complexos (SILVA et al.; 2007).

Os bolores e leveduras são também bastante resistentes às condições adversas, como pH ácido e atividade de água baixa. Os mesmos autores referem que:

A temperatura ótima de crescimento da maioria dos fungos encontra-se na faixa de 25 a 28°C, não crescendo bem nas temperaturas mesófilas (35-37°C) e raramente nas temperaturas de bactérias termo tolerantes (45°C). Seu crescimento não é incomum sob condições de refrigeração (5°C), porém, abaixo de 10°C negativos os alimentos podem ser considerados microbiologicamente estáveis (SILVA et al; 2007, p.99).

Os bolores deteriorantes de alimentos exigem oxigênio para crescimento, podendo ser considerados aeróbios estritos. Ao contrário dos bolores, muitas

espécies de leveduras são capazes de crescer na completa ausência de O_2 , e em diferentes concentrações de CO_2 .

A consistência do alimento, assim como a atmosfera de armazenamento, exerce uma considerável influência sobre os tipos de fungos que irão provocar a deterioração do produto.

De acordo com Silva et al. (2007) as leveduras predominam em alimentos líquidos, porque são unicelulares e se dispersam mais facilmente em líquidos. Os bolores são favorecidos por substratos sólidos firmes, em cuja superfície há fácil acesso ao oxigênio. Essa afirmação não deve ser entendida como absoluta, sugerindo que leveduras não possam deteriorar alimentos sólidos ou bolores alimentos líquidos. Simplesmente, as leveduras são mais competitivas em líquidos, provocando alterações percebidas mais fácil ou rapidamente.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DA PESQUISA

O estudo do presente trabalho é do tipo descritivo laboratorial, em que são descritos os procedimentos, as análises, as coletas, assim como se tem a verificação da qualidade microbiológica do produto.

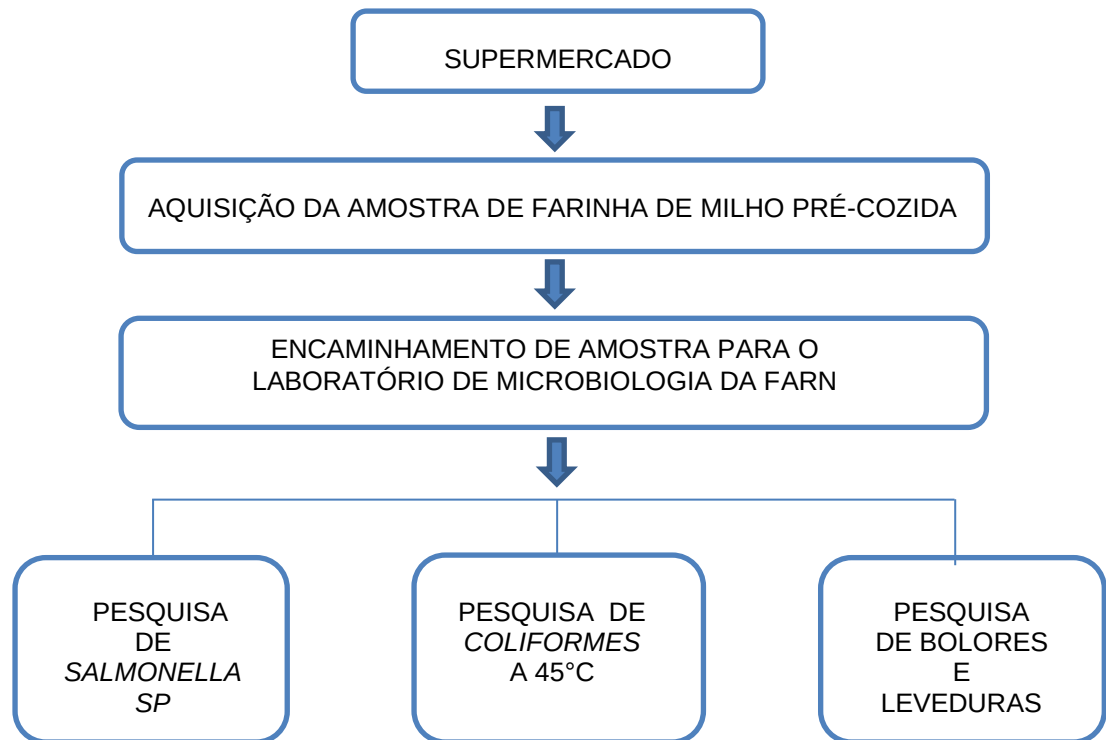
4.2 MATERIAL

O material utilizado consta de farinhas de milho pré-cozida comercializadas em estabelecimentos na cidade de Natal/RN, além de meios de cultura, vidrarias e equipamentos e utensílios disponíveis no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FARN.

4.3 AMOSTRA

Foram analisadas 5 amostras de 4 marcas comerciais diferentes de farinha de milho pré-cozida, sendo as mesmas denominadas como tipo A, B, C e D, totalizando 20 amostras, as mesmas foram adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Natal/RN, acondicionadas em embalagens de papel originais e invioladas. Cada embalagem pesava 500 g e não havia ultrapassado a metade do prazo de validade, estas foram coletadas na qualidade de consumidor, e em seguida transportadas ao laboratório de microbiologia de alimentos da FARN.

FIGURA 1 - Fluxograma da coleta das amostras para as análises microbiológicas em farinha de milho pré-cozida.



FONTE: Dados da pesquisa do autor (2011).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Preparo da Amostra

Cada amostra foi homogeneizada assepticamente. Após homogeneização, foram pesadas duas porções de 25g cada. Destas, uma foi utilizada para a pesquisa de *Salmonella sp.* e a outra para as demais contagens. Esta última porção foi colocada em um Erlenmeyer estéril com 225 ml de água peptonada a 0,1% e homogeneizada por 2 minutos, obtendo-se a diluição inicial 10^{-1} . Partindo-se desta diluição, foi feita mais duas diluições decimais (10^{-2} e 10^{-3}) utilizando o mesmo diluente.

4.3.2 Análises Realizadas

4.3.2.1 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de *coliformes* à 45°C (ICMSF, 1978).

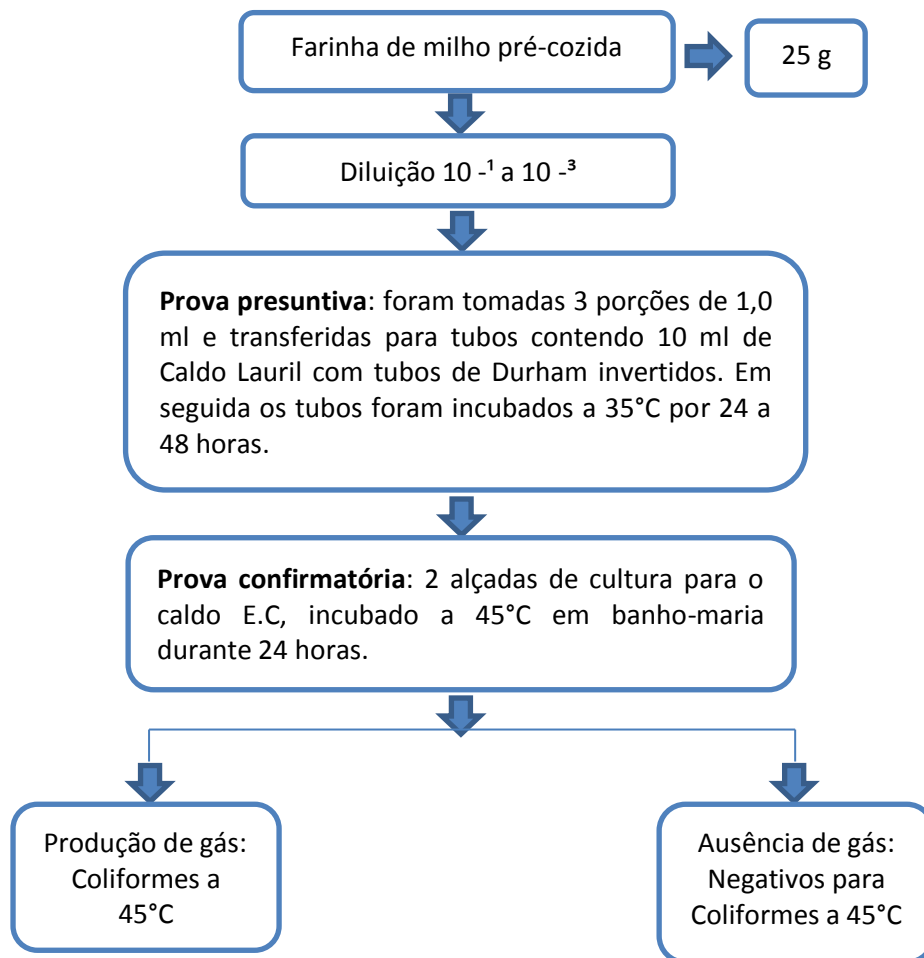
4.3.2.1.1 Prova presuntiva

De cada diluição decimal da amostra, foram tomadas três porções de 1,0 ml e transferidas para tubos contendo 10 ml de Caldo Lauril com tubos de Durham invertidos. Após completa homogeneização, os tubos foram incubados a 35°C por 24 a 48 horas. Os tubos que apresentaram turvação com produção de gás (positivos) foram submetidos à prova confirmatória.

4.3.2.1.2 Prova confirmatória

A partir dos tubos positivos da prova presuntiva, foi semeada uma alíquota de cada cultura, com uma alça de platina, para tubos contendo 10 ml de Caldo E.C. com tubos de Durham invertidos e incubados em banho-maria a 44,5°C $\pm$ 0,5°C por 24 horas. Os tubos com turvação e produção de gás, após a incubação foram considerados positivos. Para cada diluição foi anotado o número de porções positivas e, através da tabela de Hoskins (APHA, 1975), sendo determinado o NMP de coliformes à 45°C por grama do alimento analisado.

FIGURA 2 - Fluxograma da Determinação do Número Mais Provável de Coliformes a 45°C em amostras de farinha de milho pré-cozida.



FONTE: Dados da pesquisa do autor (2011).

4.3.2.2 Pesquisa da *Salmonella* sp. (ICMSF, 1978).

4.3.2.2.1 Pré-enriquecimento

Na etapa do pré-enriquecimento, o meio utilizado possibilita o reparo das injúrias sofridas pelas células, sendo portanto, de extrema importância para o isolamento.

Foram pesados 25g da amostra e transferidos para Erlenmeyer estéril contendo 225 ml de Caldo Lactosado e incubados por 24 horas à 35°C.

4.3.2.2.2 Enriquecimento seletivo

Nesta etapa, 1 ml de caldo lactosado de cada amostra foi inoculado assepticamente em um tubo contendo 10ml de Caldo Selenito-Cistina e mais 1 ml em um tubo com 10 ml de Caldo Tetrationato. Logo após, os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas.

4.3.2.2.3 Isolamento

Com uma alça de níquel-cromo, foram semeados os caldos de enriquecimento seletivo, em placas de Ágar-Verde Brilhante (VB) e Ágar-*Salmonella Shigela* (SS), em seguida foram incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias suspeitas, no VB que se apresentaram com coloração rosa ou avermelhadas e no SS que se mostraram incolores, com centro negro ou não, foram submetidas aos testes bioquímicos.

4.3.2.2.4 Triagem

Após o isolamento, foram transferidas três colônias típicas de cada placa de VB e SS para tubos contendo Agar inclinado Tríplice Açúcar – Ferro (TSI) e Lisina – Ferro (LIA). As cepas identificadas foram inoculadas na base por picada profunda e na superfície inclinada do Agar TSI e LIA, e incubadas a 35°C por 24 horas.

A prova foi considerada positiva para *Salmonella* sp. quando no TSI nos mostre o ápice alcalino (vermelho) e a base ácida (amarela), com ou sem produção de H₂S e no LIA, tanto o ápice como a base alcalina (púrpura).

4.3.2.2.5 Provas de identificação

As cepas que se revelaram positivas no TSI e LIA foram submetidas a alguns testes bioquímicos recomendados pelo FDA (1984), tais como: a prova de hidrólise da uréia, a degradação do malonato e a desaminação da fenilalanina.

Prova A: Prova de hidrólise da uréia

De culturas de 24 horas a 35°C em Ágar simples inclinado, provenientes do TSI e LIA, as cepas foram semeadas em tubos contendo 3 ml de caldo Uréia, seguido de incubação à 35°C por 24 horas. A mudança de coloração do meio indica reação positiva.

Prova B: prova da degradação do malonato

Cada cepa mantida em Ágar simples inclinado por 24 horas, foi inoculada em tubo contendo 2 ml de Caldo Malonato – Fenilalanina. Após incubação a 35°C por 24 horas, foi feita a interpretação das provas, verificadas pela mudança de cor. A prova positiva para a degradação do malonato é caracterizada pela alcalinização do meio, evidenciada pelo aparecimento de coloração azul. A maioria das cepas de salmonellas são malonato negativas.

Prova C: Teste do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)

Foi transferida uma alçada do inóculo do Agar nutriente para tubos com 3 ml de caldo VM-VP, os quais foram incubados à 35°C. Os tubos nos quais foram realizadas a prova do vermelho de metila, permaneceram na estufa por 5 dias, e nos quais foi realizada a prova de Voges-Proskauer ficaram apenas 48 horas.

Para o teste do VM, foram adicionadas 5 gotas de solução vermelho de metila, observado imediatamente se o meio adquiriu cor vermelha, indicativo de teste positivo, ou cor amarela, indicativo de teste negativo.

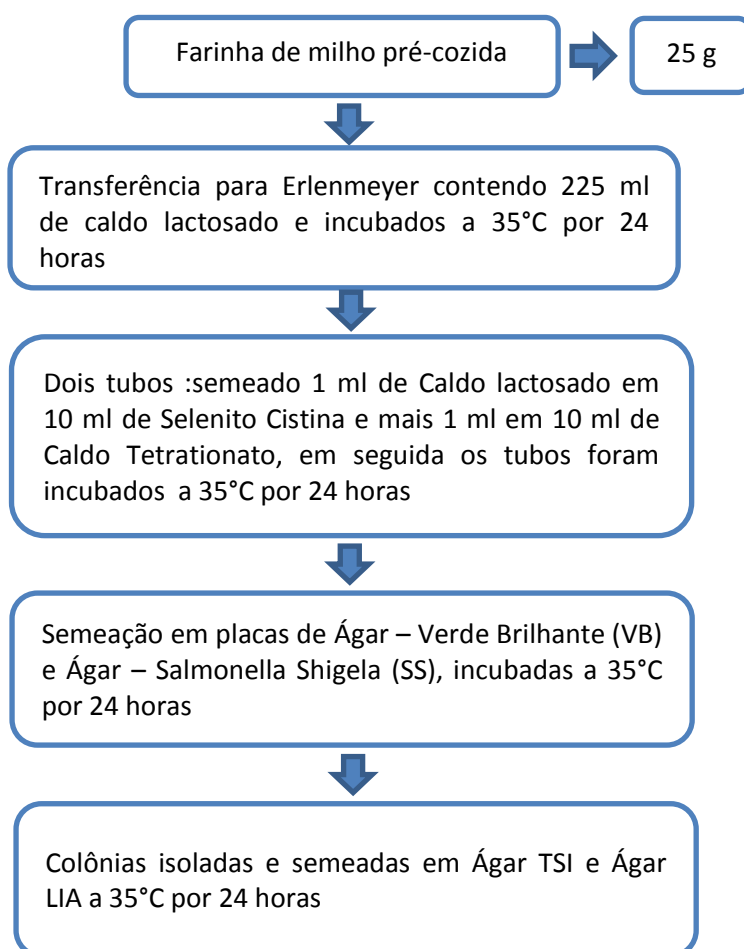
No teste do VP, foi adicionado 0,6 ml de solução alfa-naftol a 5% e homogeneizado. Em seguida foi adicionado 0,2 ml do reativo de Barrit (solução de

KOH a 40%), foi, então, homogeneizado e deixado em descanso por 1 hora, observando posteriormente, o desenvolvimento de uma coloração vermelho ou rósea, que indica teste positivo, ou a permanência da coloração amarelada ou ligeiramente esverdeada, que indica teste negativo.

Prova D: Teste do citrato

Uma alçada com inóculo da cultura em Ágar nutriente foi transferida para tubos com Ágar citrato de Simmons, estriando a superfície inclinada do meio, e então, incubada à 35°C por 48 horas. Foi observado se a coloração do meio se manteve, o que indica teste negativo, ou se foi alterada para azul, cujo resultado é positivo.

FIGURA 3 - Fluxograma da Pesquisa de *Salmonella* sp em amostras de farinha de milho pré-cozida.



FONTE: Dados da pesquisa do autor (2011).

4.3.2.3 Contagem de bolores e leveduras

4.3.2.3.1 Inoculação

Foram selecionadas três diluições adequadas da amostra e inoculadas (plaqueamento em superfície) 0,1ml de cada diluição em placas previamente preparadas e secadas, no meio de cultura Ágar Batata Dextrose Acidificado.

Foi espalhado o inóculo com uma alça de Drigalski, das placas de maior para as placas de menor diluição, até que todo o excesso de líquido foi absorvido. Para as contagens estimadas na amostra que se apresentaram menores do que 100/g ou ml, inocular 1ml da primeira diluição, distribuindo o volume por quatro placas, três com 0,3ml e uma com 0,1ml.

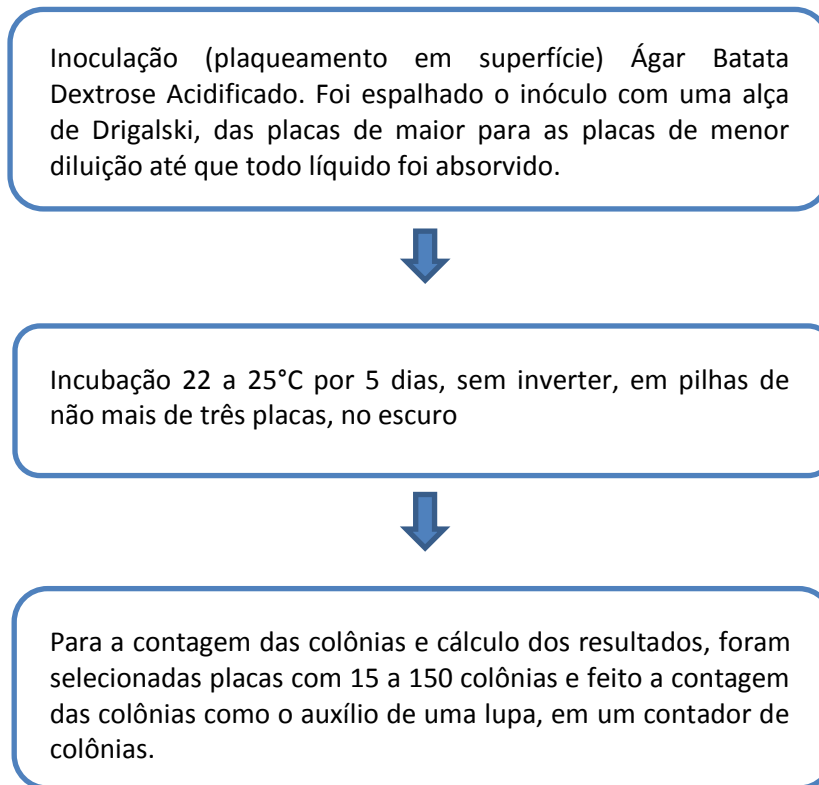
4.3.2.3.2 Incubação

Foi aguardado que as placas secassem (mínimo 15 min) e foi incubado a 22-25°C por cinco dias, sem inverter, em pilhas de não mais de três placas, no escuro.

4.3.2.3.3 Contagem das colônias e cálculo dos resultados

Para a contagem de colônias e cálculo dos resultados, foram selecionadas as placas com 15 a 150 colônias e feito a contagem das colônias com o auxílio de uma lupa, em um contador de colônias.

FIGURA 4 – Fluxograma da pesquisa de bolores e leveduras em amostras de farinha de milho pré-cozida.

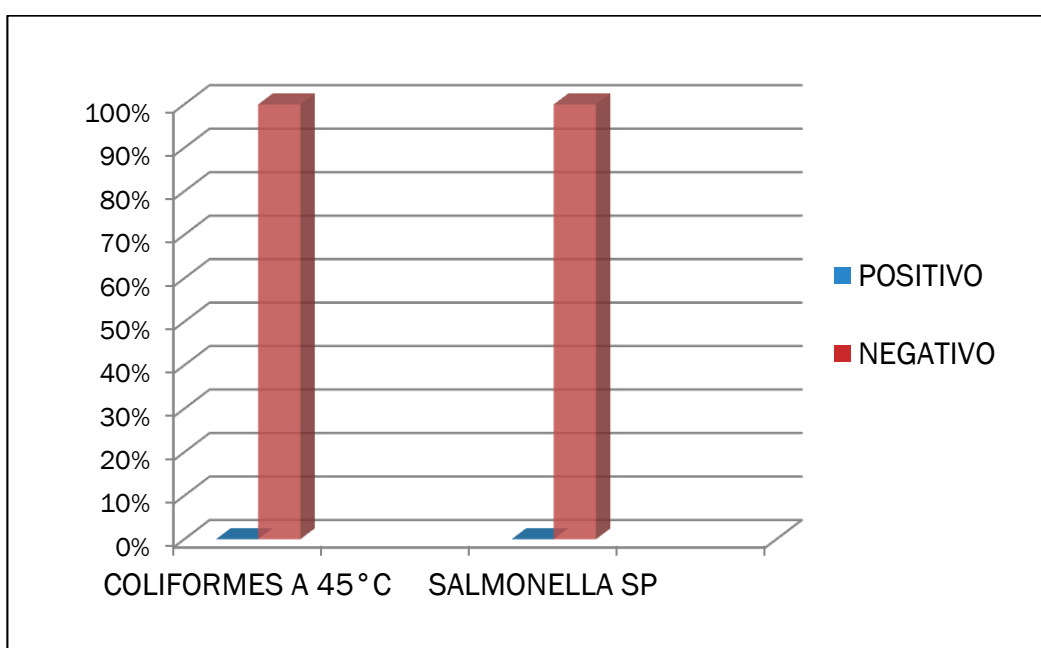


FONTE: Dados da pesquisa do autor (2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em relação aos resultados das análises microbiológicas, pode-se observar na figura 5 que não foi detectada a presença de *Coliformes* a 45°C e *Salmonella sp* em nenhuma das 20 amostras analisadas.

FIGURA 5 - Distribuição percentual de *Coliformes* a 45°C e *Salmonella sp* nas amostras analisadas em farinhas de milho pré-cozidas no município de Natal – RN.



FONTE: Dados da Pesquisa do autor (2011).

De acordo com Souza et. al (2005) pode-se definir como um alimento seguro aquele cujos constituintes ou contaminantes que podem causar perigos à saúde estão ausentes ou em concentração abaixo do limite de risco.

No presente estudo não foi constatado a presença de *Salmonella sp* e *Coliformes* a 45 ° C nas amostras analisadas, encontrando-se dentro dos padrões preconizados pela Resolução RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA, que é de: *Coliformes* a 45°C – (ausência em 1 g) e para *Salmonella* – (ausência em 25 g). Provavelmente justificado pelo fato de que nas amostras analisadas não havia existência de matéria-prima de origem animal. Pode ser também pela baixa *Aw* do alimento que não permite o desenvolvimento microbiano ou a sua sobrevivência.

A existência de poucos estudos para análise de *Salmonella* sp e Coliformes a 45°C, relacionados a esses valores microbiológicos investigados da farinha de milho pré-cozida faz com que se execute uma discussão com outros produtos como farinha de mandioca.

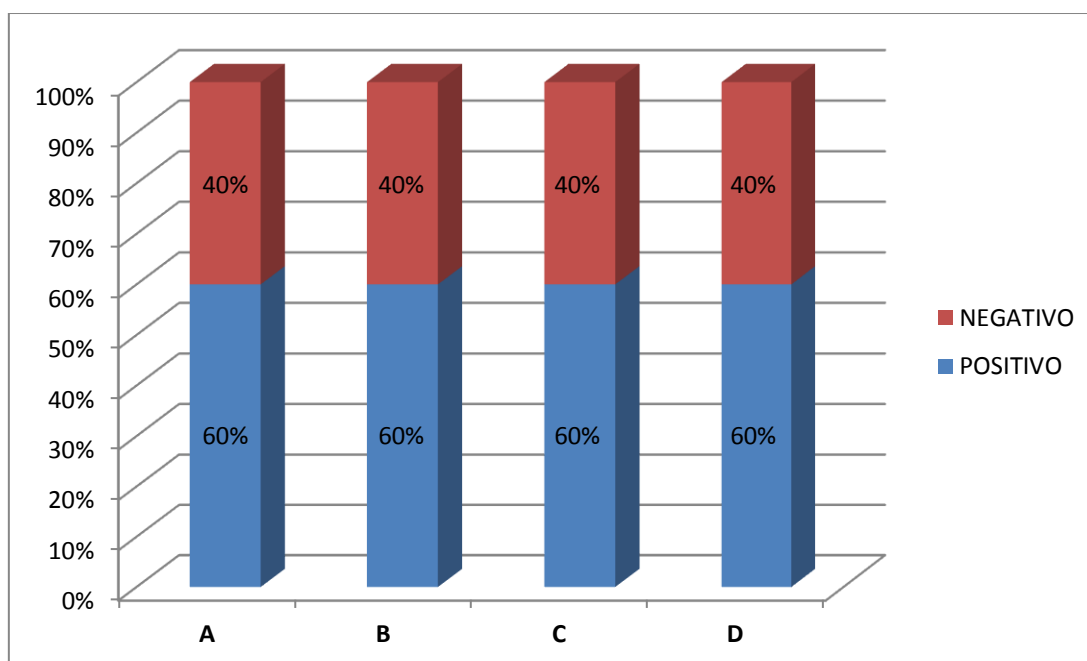
A ausência de *Salmonella* sp nas amostras analisadas foi constatado também no estudo realizado por Sousa (2006), o mesmo não detectou a presença de *Salmonella* sp na análise com farinha de mandioca. Outro estudo realizado por Almeida (2009) não detectou a presença de *Salmonella* sp. em alimentos artesanais. Estes resultados provavelmente refletem as condições higiênico-sanitárias adequadas durante o processo.

Devido a *Salmonella* sp ser potencialmente capaz de provocar infecção alimentar por sua patogenicidade, a Legislação Brasileira estabelece ausência de *Salmonella* sp em alimentos (FEITOSA et. al; 2003).

resultados semelhantes ao estudo foram encontrados por Ferreira et. al (2003) e Paiva (1991) na análise de farinha de mandioca.

A seguir, apresenta-se a figura 6 com os dados analíticos obtidos a partir das análises microbiológicas, na pesquisa para bolores e leveduras realizada com as 20 amostras denominadas A, B, C e D de farinha de milho pré-cozida.

FIGURA 6 - Distribuição percentual de bolores e leveduras nas amostras analisadas em farinhas de milho pré-cozidas no município de Natal – RN.



FONTE: Dados da Pesquisa do autor (2011).

No resultado da pesquisa para bolores e leveduras em farinha de milho pré-cozida, 60% das amostras apresentaram resultados positivos e 40% apresentaram-se negativos. Esse resultado sugere que possivelmente as condições de armazenamento pode ter sido um dos fatores determinantes para a contaminação, visto que a cada etapa as amostras foram adquiridas em um mesmo estabelecimento comercial.

A seguir apresenta-se o quadro 1 mostra a determinação de bolores e leveduras que foi realizada de acordo com a metodologia proposta pela Instrução Normativa nº 62 e os resultados expressos em número de unidades formadoras de colônias por grama, obtidos pela multiplicação do valor encontrado pelo fator de diluição correspondente. Pode-se observar que das 20 amostras analisadas 12 apresentaram resultado positivo para bolores e leveduras (A1, B1, C1, D1, A4, B4, C4, D4, A5, B5, C5 e D5).

Resultados semelhantes foram constatados no estudo realizado com farinha de milho verde por Finzer et al. (2009), onde as amostras microbiológicas indicaram bolores e leveduras ligeiramente maiores que o estabelecido pela legislação vigente.

De acordo com outro estudo realizado com fubá por Alhadas et. al (2004), os resultados também indicaram bolores e leveduras maiores que o estabelecidos pela legislação.

Os fungos infecciosos raramente são associados aos alimentos, porém, certas leveduras de origem alimentar podem desencadear reações alérgicas e alguns bolores podem provocar infecções em indivíduos imunodeprimidos. Vários bolores produzem micotoxinas, que são metabólitos tóxicos formados durante o crescimento. Os gêneros de bolores toxigênicos mais importantes são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

A existência de poucos estudos para análise de bolores e leveduras em alimentos à base de milho demonstra a necessidade de novos estudos relacionados a este tema para maiores discussões.

QUADRO 1 - Contaminação de Bolores e Leveduras nas 20 amostras de farinha de milho pré-cozida comercializadas no Município de Natal-RN.

AMOSTRAS DE BOLORES E LEVEDURAS					
MARCAS	AMOSTRAS				
A	A1	A2	A3	A4	A5
	25x10 ¹ UFC/g	Ausente	Ausente	23 x10 ¹ UFC/g	21 x10 ¹ UFC/g
B	B1	B2	B3	B4	B5
	39 x10 ¹ UFC/g	Ausente	Ausente	18 x10 ¹ UFC/g	19 x10 ¹ UFC/g
C	C1	C2	C3	C4	C5
	33 x10 ¹ UFC/g	Ausente	Ausente	20 x10 ¹ UFC/g	16 x10 ¹ UFC/g
D	D1	D2	D3	D4	D5
	42 x10 ¹ UFC/g	Ausente	Ausente	22 x10 ¹ UFC/g	15 x10 ¹ UFC/g

FONTE: Dados da Pesquisa do autor (2011).

6 CONCLUSÃO

1 - A farinha de milho pré-cozida analisada mostrou que os resultados para *Coliformes* a 45°C e *Salmonella sp* apresentaram valores inferiores aos limites estabelecidos, confirmando que o processo utilizado na produção das farinhas é satisfatório do ponto de vista higiênico-sanitário, devido a ausência de contaminação fecal e de microorganismos patogênicos.

2 - Para bolores e leveduras as análises demonstraram resultados positivos em 60% das amostras, sugerindo que possivelmente as condições de armazenamento foram insatisfatórias, desta forma não apresentando segurança alimentar para o consumidor, representando risco à saúde da população consumidora deste alimento potencialmente tradicional na região.

3 - É importante um controle adequado do plantio, durante o processamento, transporte e armazenamento para garantir a qualidade microbiológica do produto.

REFERÊNCIAS

ALHADAS et al., Contagem de bolores e leveduras em fubá e identificação de Gêneros potencialmente toxigênicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, PR, p.79-82, 2004.

ALMEIDA et al., Qualidade sanitária de alimentos artesanais produzidos na região do alto Jequitinhonha. **Revista Higiene Alimentar**, v.23, p.47-52, 2009.

ARAÚJO, W. M. C. et al., **Alquimia dos alimentos**. Brasília: Senac Nacional, 2009.

BOTELHO, Raquel Braz Assunção. **“Cultura alimentar e alimentação saudável”**. Brasília – DF, 2006. 45 f. monografia (Pós-graduação em Ciências da Saúde) – Departamento de Nutrição, Universidade de Brasília – UNB.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Disponível : <[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. RDC n. 12 de 12 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos** [capturado em 05 de agosto de 2010].

FAGLIARI, Gabriela Scusa. **Turismo e alimentação**: análises introdutórias. São Paulo: Roca, 2005.

FERREIRA, Sandra Maria dos Santos. **“Contaminação de alimentos ocasionada por manipuladores”**. Brasília – DF, 2006. 48 f. monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos) – Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília – UNB.

FINZER, J.R..B et al. Análise microbiológica de farinha de milho verde doce produzida através de desidratação osmótica. **VIII Jornada Científica da FAZU**, Uberaba, MG, p.38-43, 2009.

FORSYTHE, S.S. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3ªed. Barueri, São Paulo; Manole, 2008.NASCIMENTO, M.G.F;

MELO-FILHO, G. A.; RICHETTI, A. Aspectos socioeconômicos da cultura de milho. Embrapa, Circular Técnica, v.5, p.12-21, 1997

NASCIMENTO, E.R. Importância da avaliação microbiológica na qualidade e segurança de alimentos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000.

PAES, M.C.D., Aspectos físicos,químicos e tecnológicos do grão de milho.**Circular técnica**.Dez.2006,MG.Disponívelem:<<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publicacao.php>> acesso em 30 de junho de 2010.

RIBEIRO et al., Fungos filamentosos isolados de produtos de milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasil Bot.**, v.26, p. 223-229, jun. 2003.

SILVA JR, E.A.; **Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação**. 6º Edição. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

SILVA, Neusely da et. al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SANTOS, A.B. et al., **Avaliação microbiológica em derivados de milho** Disponível:<<http://www.eventosufrpe.com.br/eventosufrpe/jepex2009/cd/resumos/R0401-2.pdf>> .

SOUSA, E.L.; SILVA, C.A.; SOUSA, C.P. Qualidade Sanitária de Equipamentos, Superfícies, Água e Mãos de Manipuladores de Alguns Estabelecimentos que comercializam alimentos na Cidade de João Pessoa, PB. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, 2004.

UNIVERSIDADE. DE BRASÍLIA. Faculdade de ciência da saúde, Departamento de Nutrição. Alimentação e Cultura. Brasília: UNB, [200?].

VALE DO LIMA. **Distribuição de produtos regionais**. 2009. Disponível em <<http://www2.spi.pt/linea/limacria-produtos%20regionais.pdf>> acesso em 19 Out.2008.

ZAFFARI, C.B. et al., Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estados do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n. 3, p. 863, Maio/Jun, 2007.