

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS NA INDÚSTRIA DE REFRIGERANTES

COMPARISON OF MICROBIOLOGICAL ANALYSIS METHODS IN THE SOFT DRINK INDUSTRY

Francisca Maria Rosiki Conti¹

Resumo: A água é essencial para os seres vivos. Também é um dos principais meios de transporte de contaminantes como bactérias patogênicas. Sendo assim a qualidade da água deve atender requisitos básicos para que possa ser consumido pela população e para utilização em indústrias. O objetivo deste trabalho foi realizar uma comparação de dois métodos de análises (Petri-film® e Substrato Cromogênico) da água na indústria de bebidas, contribuindo para o estudo de

validação do método Petrifilm® para análise de água de processo para os microrganismos coliformes. Atualmente apenas o método de Substrato Cromogênico é validado pelo Standart Methods for the Examination of Water e Wastewater. O estudo foi realizado numa refrigeranteira na cidade de Jundiaí-SP. Os testes foram realizados no tempo de 6 meses semanalmente (para água de processo) e mensal (para swab de linha). Pontos específicos foram escolhidos para a coleta das

¹ Especialista em Análises clínicas e microbiologia pela FAVENI



amostras conforme procedimento interno. Os resultados obtidos demonstraram que o método Petrifilm® não foi eficaz para demonstrar presença de coliformes e comparação com o substrato cromogênico.

Palavras chaves: Coliformes. Qualidade microbiológica de água. Metodologia.

Abstract: Water is essential for living beings. It is also one of the main means of transporting contaminants such as pathogenic bacteria. Therefore, water quality must meet basic requirements so that it can be consumed by the population and for use in industries. The objective of this work was to carry out a comparison of two analysis methods (Petrifilm® and Chromogenic Substrate) of water in the beverage industry, contri-

buting to the validation study of the Petrifilm® method for analysis of process water for coliform microorganisms. Currently, only the Chromogenic Substrate method is validated by the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. The study was carried out in a soda fountain in the city of Jundiaí-SP. Tests were performed over a period of 6 months, weekly (for process water) and monthly (for line swab). Specific points were chosen for sample collection according to the internal procedure. The obtained results demonstrated that the Petrifilm® method was not efficient to demonstrate the presence of coliforms and comparison with the chromogenic substrate.

Keywords: Coliforms. Microbiological quality of water. Methodology.



INTRODUÇÃO

Os refrigerantes são bebidas não alcoólicas consumidas em grande escala pela população. Em escala mundial, o Brasil se encontra como o 7º maior mercado de bebidas não alcoólicas em 2020 (ETENE, 2022). É composto basicamente por água (principal matéria – prima), açúcar, suco natural, corantes, aromatizantes, antioxidantes, conservantes e gás carbônico (SWEETMAN et al, 2008).

Devido sua alta atividade de água (Aa), alto teor de açúcar e ph menor que 4.3, estes produtos são susceptíveis a proliferação de: bolores, leveduras e bactérias do grupo coliforme. Neste caso conforme Portaria do Ministério da Saúde nº 2914 de 12 de dezembro de 2011, os parâmetros pré-estabelecidos em 100 mL de amostra de água é de

ausência total de microrganismos coliformes (BRASIL, 2011). O grupo coliforme total apresenta cerca de 20 espécies no qual as bactérias na forma de bastonetes Gram - positivas são capazes de fermentar a lactose com produção de gás.

Conforme (LIMA, 2009), as etapas do processo industrial de refrigerantes são automáticas evitando ao máximo possível contato manual com o produto, garantindo a qualidade final do refrigerante, sendo todo o processo dependente das BPF (Boas Práticas de Fabricação), análises físico-químicas e microbiológicas.

A RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 exige os parâmetros de contagens de coliformes a 35 °C (ausência /50mL) (MORAES et al, 2003).

Caso seja comprovada a presença de coliformes, há indi-



cação de más condições sanitárias de manipulação e fabricação do produto, podendo levar a deterioração, alteração de cor, odor e sabor.

No presente trabalho iremos abordar a comparação de dois métodos de análise microbiológica: Petrifilm® e Substrato Cromogênico. O Substrato é descrito no Standart Methods for the Examination of Water e Wastewater, na 19ª Edição em 1995 para análise de água. Já o Petrifilm® é amplamente utilizado na indústria, pois diminui o tempo de preparo de meio de cultura e diminui espaço de armazenamento mas ainda não está validado para análise de água de processo.

Através dos resultados desta pesquisa poderemos contribuir para uma futura validação do método Petrifilm® para análise de água em indústria alimen-

tícia.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das amostras de água é realizada em pontos específicos seguindo uma periodicidade pré-estabelecida.

MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO ÁGUA DE PROCESSO



Tabela 1 - Pontos de coleta água de processo

| PONTOS | PARÂMETROS | PERIODICIDADE | PONTO DE COLETA REFRIGERANTE | PONTO DE COLETA XAROPE | LIMITES |
|--|-------------------|---------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------|
| ETA, poço, reservatórios, rinser, rede pública, engarrafamento caixa d'água, tanque Areia 1 e 2, polidores e decolorador | Bactérias totais | SEMANAL | Registros específicos de cada ponto | | Máx. 500 UFC/ml |
| | Coliformes totais | SEMANAL | | | Ausência |

**MONITORAMENTOS MI-LINHA DE PRODUÇÃO
CROBIOLOGICOS S W A B**

Tabela 2 – Pontos de coleta swab

| PONTOS | PARÂMETROS | PERIODICIDADE | PONTO DE REFRIGERANTE | PONTO DE XAROPE | LIMITES |
|--|-------------------|---------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Tanque: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, TL, Registros: R4, R5, R6, R7, R8, R9, TL, Enchedora: 2 bicos aleatórios (tulipa, bico, esnifre), cuba de água, cuba de xarope e tanque engarrafamento | Bactérias totais | MENSAL | Registros específicos de cada ponto | | Máx. 500 UFC/ml |
| | Coliformes totais | MENSAL | | | Ausência |



MONITORAMENTOS DA POTABILIDADE

Tabela 3 – Parâmetros e periodicidade

| PONTOS | Poço Bruto | Reservatório | Engarrafamento | Abastecimento público | Vapor |
|---------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| PERIODICIDADE | Semestral (intercalado) | Semestral | Semestral | Semestral | Anual |
| PARÂMETROS | GM/MS n°888 (reduzida/completa) | GM/MS n°888 (reduzida) | GM/MS n°888 (reduzida) | GM/MS n°888 (reduzida) | GM/MS n°888(reduzida) |

AMOSTRAS ANALISADAS

O estudo baseou-se na coleta de amostras com 100 mL de água em frascos estéreis na frequência semanal durante 6 meses, e coleta de swab na frequência mensal também no período de 6 meses.

Seguindo procedimento interno da empresa, foram realizadas as análises microbiológicas para bactérias heterotróficas e coliformes. Conforme abordagem

do trabalho, focaremos apenas nos resultados de coliformes utilizando simultaneamente os dois métodos (Petrifilm® e Substrato Cromo gênico).

MÉTODO PETRIFILM® EC .

A placa Petrifilm® é um sistema pronto de meio de cultura que contém nutrientes do Vermelho Violeta Bile (VRB), um agente geleificante solúvel em água fria, e um indicador tetrazó-



lio que facilita a enumeração da colônia. Estas são indicadas por colônias vermelhas associadas ao gás.

Para realizar a inoculação foi necessária uma diluição prévia de água de processo e do swab em solução peptonada 0,1%.

DILUIÇÃO

Para amostragens pequenas utilizou-se fator de diluição 10, ou seja, 1mL de alíquota de amostra para 9 mL de diluente.

PROCEDIMENTOS DE INOCULAÇÃO DIRETA DE ÁGUA DE PROCESSO

Os Petrifilms® foram posicionados na bancada e identificados. Pipetou-se 1mL da amostra levantando o filme su-

perior e depositando o inóculo no centro da área circular do filme inferior. Baixou o filme superior sobre o inóculo, posicionando o difusor plástico no centro da placa e aplicou uma leve pressão para espalhar. Realizou-se este procedimento antes do gel se formar. Não houve o arraste o difusor sobre o filme.

Removeu-se o difusor e as placas foram deixadas em repouso durante pelo menos um minuto para permitir que o gel solidificasse.

Terminada a inoculação as amostras foram encaminhadas para a estufa bacteriológica na temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

PROCEDIMENTOS DE INOCULAÇÃO DE ÁGUA DE PROCESSO POR SUBSTRATO CROMOGÊNICO



Coletaram-se as amostras em frascos de 100 mL. No caso de água clorada, foram adicionadas inativador de cloro conforme orientação do fornecedor.

No laboratório microbiológico utilizando técnicas assépticas, acrescentou-se a amostra o substrato cromogênico e foram homogeneizadas. As amostras foram encaminhadas a estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ entre 18 a 48 horas.

O substrato cromogênico utilizado nas análises foi desenvolvido para determinar a presença ou a ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* através da técnica da cultura, descrito no Standard Methods for the Examination of Water e Wastewater, na 19ª Edição em 1995.

O substrato possui em sua formulação substrato hidrolisável MUG que na presença da enzima β -D glucuronidase, ini-

tem o crescimento de bactérias Gram-positivas, favorecendo o crescimento de bactérias do grupo Coliforme.

PROCEDIMENTOS DE COLETA DE SWAB NA LINHA DE PRODUÇÃO

Após a realização da sanitização dos equipamentos da linha de refrigerante, coletaram-se os materiais para análise microbiológica através de swabs estéreis. Antes da coleta foi necessário preparar previamente os tubos de ensaio com água peptonada a 1% no volume de 9 mL por tubo para realizar inoculação.

COLETA DOS SWABS

- Os swabs foram levados para a área de coleta
- Abriu-se a tampa do tubo e retirou o swab asseptica-



mente do tubo;

- Deslizou o swab assepticamente sobre a superfície, girando-o de forma que toda sua ponta de algodão entrasse em contato com a superfície coletora. Retornou o swab ao tubo fechando logo em seguida a sua respectiva tampa.

PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO DE SWAB POR PETRIFILM® E POR SUBSTRATO CROMOGÊNICO

As amostras de swab foram inoculadas pelo método idêntico ao de inoculação de Petrifilm® de água de processo. Para inoculação por substrato cromogênica, este foi realizado de forma experimental respeitando a proporção volume de água peptonada por tubo de ensaio por quantidade em gramas de substrato.

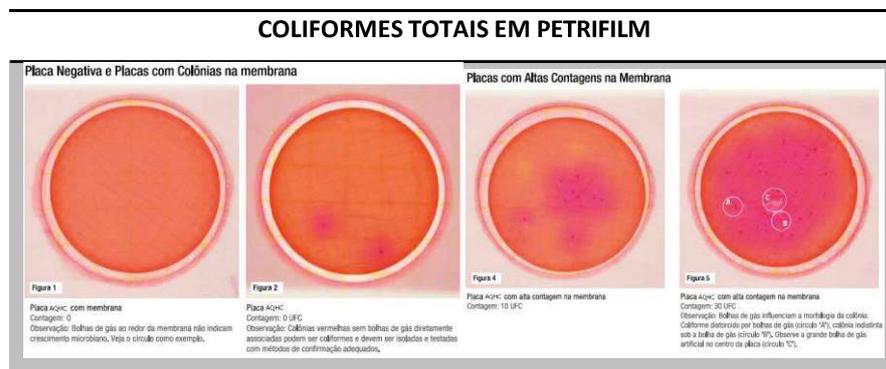
INTERPRETAÇÕES DE RESULTADOS

Para Petrifilm:

Utilizou-se um contador de colônias comum para realização da contagem. Procedeu-se à contagem das colônias vermelhas, independente do tamanho ou intensidade da cor. Determinou-se o número de UFC/g ou mL multiplicando pelo inverso da diluição (UFC/g ou mL n° colônias/diluição). Nas placas de alta sensibilidade foi considerado o volume de 5mL inoculado no cálculo do resultado (UFC/g ou $Ml = n^{\circ} \text{colônias} / 5 \times \text{diluição}$).



Imagem1 – Apresentação de coliformes na Petrifilm®.



Fonte: 3M-Guia de interpretações E.coli.

PARA SUBSTRATO CROMOGÊNICO

Após o período de incubação foi considerado:

1- Para resultado negativo (ausência de coliformes totais e E. coli) com leitura final com 48 horas, a amostra permaneceu na cor púrpura

2- Para resultado positivo (presença de coliformes) com leituras parciais a partir de 18 horas e leituras finais com 48 horas as amostras apresentariam coloração iniciando por amostras

verde-amareladas, marrons, caramelo e para amarelo claro ao amarelo ouro (caracterizado pela variação do pH da amostra e da concentração final das bactérias coliformes e termo-tolerantes que apresentam crescimento tardio).



Imagem 2 – Coloração do substrato cromo gênico

SUSBSTRATO CROMO GÊNICO



Fonte: LKP – Diagnósticos

12. CONCLUSÃO

A conclusão deste estudo contribuiu para que no momento não seja possível validar o método Petrifilm® para análise de água de processo. Neste estudo apenas o método de substrato cromo gênico é validado pelo Standart Methods for the Examination of Water e Wastewater o qual apresentou alteração da cor púrpura para amarela (indicando presença de coliformes). Não foi indicada presença de colônias de coliformes no método Petrifilm® favorecendo a validação do mé-

todo cromogênico como sendo mais preciso.

Foi analisado um total de 288 amostras do conjunto de pontos da água de processo fabril (13 pontos de coleta cada) e 156 amostras de swab com todos os pontos mencionados anteriormente da linha de produção (Tabela 1 e 2). Durante o período de análise foi constatado 6 pontos com contaminação por coliformes onde

apenas o método substrato cromogênico detectou presença. Já no método Petrifilm®



não houve presença de colônias de coliformes.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância de qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. DO República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de dez. 2011, Seção 1, pág.39-46. 2011.

CUNHA, H. V. F. Qual a importância da água na indústria de alimentos; Food Safety Brazil - Segurança de Alimentos, 2016, disponível em: <<http://foodafetybrazil.org/imoirtancia-da-a-gua-na-industria-de-alimentos>>, acesso em 10 de novembro de 2022.

ETENE. Escritório Técnico de Estudos do Nordeste. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bits-tream/123456789/905/1/2021_CDS_175.pdf> Acesso em: 28 nov.2022.

FUNASA. Manual prático de análises de água. Brasília, DF. Ed,Coordenação Social 2ª ed. rev.-Brasília: Fundação Nacional de Saúde,2006. Acesso em 05/11/2022.

LIMA, A.C.S.; AFONSO, J.C. A Química do Refrigerante. 2009. Disponível em: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnese31_3/10-PEQ-0608.pdf Acesso em: 01 dez.2022.

MORAIS, VAD et al. Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializados no Estado de Minas Gerais. Rev.do



Inst. Adolfo Lutz, v.62, n.1. P1-4,
2003.

SILVA, N et. Manual de Méto-
dos de Análise Microbiológica
de Alimentos e Água. 4. Ed. São
Paulo: Livraria Varela; 2010.

SWEETMAN, C; WARDLE, J;
COOKE, L. - Soft drinks and
“desireto drink” in preschoolers.
Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.,
v.5, n.60, p.1-5, dez. 2008.

3M. Guia de interpretações.
<[http://multimedia.3m.com/mws/
media/586857o/guia-de-interpr-
-petrfilm-ecoli-e- coliformes.
pdf](http://multimedia.3m.com/mws/media/586857o/guia-de-interpr-petrfilm-ecoli-e-coliformes.pdf)>, acesso em 02/12/2022.

