

ERNY MARCELO SIMM

**INTERFERÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS E MICRORGANISMOS
NA TÉCNICA DE ATP BIOLUMINESCÊNCIA**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para a obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

ERNY MARCELO SIMM

**INTERFERÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS E MICRORGANISMOS
NA TÉCNICA DE ATP BIOLUMINESCÊNCIA**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para a obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

APROVADA: 29 de junho de 2004

Prof^a. Regina Célia Santos Mendonça
(Conselheira)

Prof^a Edimar Aparecida Filomeno
Fontes

Prof. Frederico José Vieira Passos

Prof. Renato Souza Cruz

Prof. Nélcio José de Andrade
(Orientador)

A Deus
Aos meus pais,
Egon Simm, meu eterno incentivador e Vidalvina Gomes Simm, por seu
infinito amor e orações.
Aos meus irmãos, Eliane Simm e Elder Simm.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as coisas.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, compreensão, dedicação e incentivo.

Aos meus irmãos, pelo amor, amizade e incentivo.

À minha namorada Gisele, pelo imensurável amor e carinho.

Ao meu professor Nélcio José de Andrade, por exercer em sua plenitude o papel de orientador, e mais que isso, por seu apoio, incentivo, amizade e muitas e muitas horas de dedicação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste curso.

Aos professores Regina Célia Santos Mendonça e José Benício Paes Chaves, pelos valiosos conselhos, sugestões e avaliação crítica do trabalho.

Aos professores Frederico José Vieira Passos, Renato Souza Cruz e Edimar Aparecida Filomeno Fontes pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao professor Sebastião César Cardoso Brandão, por disponibilizar seu Laboratório e equipamentos.

À professora Célia Alencar de Moraes, do Departamento de Microbiologia/UFV, pelo fornecimento de cepas empregadas neste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFV, pela atenção, amizade e apoio.

Às minhas estagiárias e amigas Emiliane e Priscila, pela ajuda e companheirismo nas longas horas de trabalho no Laboratório.

Aos amigos de Laboratório Keily, Franceline, Júnia, Kelly, Fernanda, Érica e Paula, pela amizade e apoio.

Ao meu grande amigo João Francisco, pela sua sincera amizade, que me traz tanto orgulho e satisfação.

Aos inesquecíveis amigos da EAL 97, pelos momentos de diversão e pela amizade.

Ao amigo Anderson, por me ouvir a qualquer momento e por me ensinar a ser uma pessoa melhor.

Aos amigos de república, em especial Xuxu (Ricardo), Abrão (Ebert), Kaskudo (Marcel) e Nego (Marcílio), pelos bons momentos compartilhados.

Ao amigo Baroncio, pelo incentivo e amizade.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal.

BIOGRAFIA

ERNY MARCELO SIMM, filho de Egon Simm e Vidalvina Gomes Simm, nasceu em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, em 14 de outubro de 1978, mas um douradense de coração.

Em maio de 2002, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa.

Em abril de 2002, iniciou o curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Higienização na indústria de alimentos.....	3
2.2. Técnica de ATP-bioluminescência.....	5
2.3. Substâncias orgânicas.....	11
2.3.1. Lipídeos.....	12
2.3.2. Carboidratos.....	14
2.3.3. Caseína.....	15
2.4. Microrganismos: <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Staphylococcus carnosus</i>	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Quantificação de proteína, lipídeo e carboidrato em um embutido fermentado cárneo.....	19
3.2. Quantificação do resíduo orgânico em superfície de aço inoxidável após contato com massa cárnea.....	21
3.3. Preparo de suspensões e soluções de substâncias orgânicas e microrganismos para uso em análises da interferência na determinação de ATP pela técnica de bioluminescência.....	22
3.3.1. Preparo de suspensões e soluções de substâncias orgânicas.....	22

3.3.1.1. Preparo de suspensão de caseína.....	23
3.3.1.2. Preparo de suspensão de lipídeo.....	24
3.3.1.3. Preparo de solução de sacarose.....	24
3.3.2. Preparo de suspensões de microrganismos.....	25
3.3.2.1. Preparo de suspensão de <i>Staphylococcus carnosus</i>	25
3.3.2.2. Preparo de suspensão de esporos de <i>Bacillus subtilis</i> ...	26
3.4. Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos na determinação de ATP pela técnica de bioluminescência em análises “in vitro”.....	27
3.4.1. Determinação de ATP nas suspensões e soluções testes....	28
3.5. Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável na determinação de ATP pela técnica de bioluminescência.....	29
3.5.1. Determinação de ATP nos cupons de aço inoxidável.....	30
3.6. Delineamento experimental e análise dos resultados.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos em suspensão na determinação do número de URL.....	35
4.1.1. Interferência de substâncias orgânicas.....	35
4.1.2. Interferência de microrganismos.....	38
4.1.3. Interferência de combinações entre substâncias orgânicas e microrganismos.....	39
4.2. Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável na determinação do número de URL.....	43
4.2.1. Interferência de substâncias orgânicas.....	44
4.2.2. Interferência de combinações entre substâncias orgânicas e microrganismos.....	45
5. CONCLUSÕES.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
7. APÊNDICE.....	60

LISTA DE QUADROS

1. Suspensões e soluções contendo substâncias orgânicas ou microrganismos de forma isolada ou combinadas entre si para avaliar a interferência no número de Unidades Relativas de Luz.....	28
2. Suspensões e soluções contendo substâncias orgânicas ou microrganismo de forma isolada ou combinadas entre si, aderidas aos cupons de aço inoxidável AISI 304, nº4, para avaliar a interferência na determinação do número de Unidades Relativas de Luz.....	30
3. Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas ou de microrganismos de forma isolada ou combinadas entre si.....	36
4. Média e desvio padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de caseína, lipídeo e sacarose.....	37
5. Média e desvio padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz das suspensões e soluções de substâncias orgânicas.....	38
6. Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões de caseína, lipídeo ou sacarose adicionadas de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL ⁻¹ de <i>Staphylococcus carnosus</i>	40
7. Média e desvio padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz das suspensões e soluções de substâncias orgânicas adicionadas de microrganismos.....	42

8. Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções contendo substâncias orgânicas ou microrganismo de forma isoladas ou combinadas entre si, aderidas aos cupons de aço inoxidável AISI 304, nº4.....	43
9. Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas aderidas ao aço inoxidável.....	45
10. Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões de microrganismos, adicionadas ou não de três substâncias orgânicas, aderidas ao aço inoxidável.....	46
11. Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas adicionadas ou não de microrganismos, aderidas ao inoxidável.....	48

LISTA DE FIGURAS

1. Esquema da reação entre adenosina trifosfato (ATP) e o complexo luciferina/luciferase, tendo luz como um dos produtos..... 7
2. Logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões de *Staphylococcus carnosus* ($5,4 \times 10^3$ CDM.cm⁻²; $5,4 \times 10^2$ CDM.cm⁻² e $5,4 \times 10^1$ CDM.cm⁻²) ou esporos de *Bacillus subtilis* ($2,9 \times 10^3$ CDM.cm⁻²; $2,9 \times 10^2$ CDM.cm⁻² e $2,9 \times 10^3$ CDM.cm⁻²), adicionadas ou não de caseína (7,0 mg.mL⁻¹), lipídeo (14,0 mg.mL⁻¹) e sacarose (1,2 mg.mL⁻¹), aderidas ao aço inoxidável AISI 304, nº 4..... 46

RESUMO

SIMM, Erny Marcelo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2004.
Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos na técnica de ATP-bioluminescência. Orientador: Nélcio José de Andrade. Conselheiros: Regina Célia Santos Mendonça e José Benício Paes Chaves.

Avaliou-se a interferência da caseína, lipídeo, sacarose, *Staphylococcus carnosus* e esporos de *Bacillus subtilis* na determinação da bioluminescência. As substâncias orgânicas e os microrganismos em suspensões ou aderidos ao aço inoxidável, AISI 304, nº 4 foram analisados isoladamente e em combinações. A bioluminescência foi determinada em luminômetro comercial, com os resultados expressos em Unidades Relativas de Luz (URL). Em relação às suspensões preparadas com três substâncias orgânicas, houve um aumento ($p < 0,05$) no número de URL com a presença de caseína e lipídeo. A sacarose reduziu a bioluminescência. Neste mesmo tipo de suspensão aderida ao aço inoxidável, o número de URL aumentou ($p < 0,05$) com a presença de caseína e sacarose. O lipídeo reduziu a bioluminescência. Constatou-se um maior ($p < 0,01$) número de URL nas suspensões com $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ de *S. carnosus* em relação aquelas com $2,9 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ de esporos de *B. subtilis*. No que se refere às suspensões de células vegetativas ou esporo bacteriano aderidas ao aço inoxidável, adicionadas ou não das três substâncias orgânicas, a bioluminescência para *S. carnosus* foi sempre maior ($p < 0,05$) do que para os esporos de *B. subtilis*, independente da concentração estudada. As três

substâncias orgânicas reduziram o número de URL ($p < 0,05$) quando combinadas com $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ de *S. carnosus*. Quando se utilizou esporo de *B. subtilis*, as três substâncias orgânicas não tiveram nenhum efeito significativo ($p \geq 0,05$) na determinação da bioluminescência. Três resultados diferentes foram observados quando se compararam as suspensões contendo simultaneamente as três substâncias mais célula vegetativa e aquelas que continham somente o microrganismo, todas aderidas ao aço inoxidável: redução ($p < 0,05$) no número de URL, quando a bactéria estava na concentração de $5,4 \times 10^3$ CDM.cm⁻², aumento na bioluminescência ($p < 0,05$) nas suspensões onde *S. carnosus* estava presente na concentração de $5,4 \times 10^2$ CDM.cm⁻² e nenhuma diferença significativa ($p \geq 0,05$) foi detectada em presença de célula vegetativa na concentração de $5,4 \times 10^1$ CDM.cm⁻². Foi detectado um aumento no número de URL nas suspensões de caseína, lipídeo e sacarose adicionadas de $2,9 \times 10^3$ CDM.cm⁻² esporos de *B. subtilis* em relação à suspensão com as três substâncias orgânicas, todas aderidas ao aço inoxidável. Na comparação envolvendo as outras duas concentrações de esporo bacteriano e a suspensão com as três substâncias, percebeu-se uma redução no número de URL. As substâncias orgânicas, os microrganismos e as combinações entre eles, tanto em análises em suspensão quanto aderidos ao aço inoxidável interferiram em maior ou menor grau na técnica de bioluminescência. A determinação de ATP nas superfícies não deve ser a única técnica usada para monitorar a eficiência da higienização em indústrias de alimentos. Ela pode ser utilizada como uma ferramenta complementar da avaliação microbiológica tradicional. Além disso, para a obtenção de informações confiáveis, deve-se entender as limitações dessa técnica.

ABSTRACT

SIMM, Erny Marcelo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June, 2004.
Interference of organic substances and microorganisms in the ATP-bioluminescence technique. Adviser: Nélcio José de Andrade. Committee Members: Regina Célia dos Santos Mendonça e José Benício Paes Chaves.

The casein, lipid, sucrose, *Staphylococcus carnosus* and *Bacillus subtilis* spores interference in the bioluminescence measurement was evaluated. The organic substances and the microorganisms, presents in suspensions or adhered to the stainless steel, were analyzed separately and in combinations. A commercial luminometer was used, with the results expressed in Relative Units of Light (RUL). In relation to the suspensions with the three organic substances, there were an increase ($p < 0,05$) in the RUL measurements with the casein and lipid addition. The sucrose reduced the bioluminescence. In this same suspension, adhered to the stainless steel, the RUL measurements were increased ($p < 0,05$) with the casein and sucrose addition. The lipid reduced the bioluminescence. It was verified ($p < 0,01$) a higher RUL measurement in the suspensions with $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ of *S. carnosus* in relationship those with $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ of *B. subtilis* spores. For the suspensions of vegetative cells or bacterial spores adhered to the stainless steel, added or not of the three organic substances, the RUL measurements for *S. carnosus* were always higher ($p < 0,05$) than for the *B. subtilis* spores. The suspension containing the three organic substances decreased ($p < 0,05$) the RUL measurement when

added of $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ of *S. carnosus*. When the microorganism was *B. subtilis* spores, the three organics substances did not showed difference ($p \geq 0,05$) in the bioluminescence measurement. Three different results in the bioluminescence were observed in the comparison among the suspensions containing the three substances added of vegetative cell and those that contained only the microorganism, all of them adhered to the stainless steel: it was a reduction ($p < 0,05$) in the measurement of RUL, when the bacteria were in the concentration of $5,4 \times 10^5$ CDM.mL⁻¹, it was observed an increase in the bioluminescence ($p < 0,05$) in the suspensions when *S. carnosus* was present in the concentration of $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ and it was not observed difference ($p \geq 0,05$) when the vegetative cell was in the concentration of $5,4 \times 10^3$ CDM.mL⁻¹. An increase was detected in the RUL measurement in the casein suspensions, lipid and sucrose added of $2,9 \times 10^{-3}$ CDM.cm⁻² of *B. subtilis* spores in relation to the suspension with the three organic substances, all adhered to the stainless steel. In the comparison involving the other two concentrations of bacterial spore and the suspension with the three substances, it was observed a decrease in the RUL measurement. The organics substances, microorganisms and their combinations, in suspensions or adhered to stainless steel, showed an interference on ATP bioluminescence measurements. This technique should be used as an auxiliary tool associated to traditional microbiological analysis.

1. INTRODUÇÃO

A segurança dos alimentos tem se tornado um item de preocupação crescente, para os consumidores, para os órgãos governamentais responsáveis pela saúde pública, bem como, para produtores e indústria de alimentos. Como consequência, é cada vez maior a pressão sobre as indústrias envolvidas no processamento de alimentos e bebidas no que diz respeito aos padrões de qualidade durante a manufatura e obtenção do produto final.

A implantação de programas de higienização mais rigorosos tem sido uma necessidade na indústria de alimentos. Isto se deve a fatores como o desenvolvimento de novos produtos, as novas tecnologias no processamento de alimentos, as exigências comerciais de novos mercados, consumidores mais exigentes e os relatos de doenças veiculadas por alimentos, particularmente àquelas de origem bacteriana. Todos os processadores de alimentos têm responsabilidade direta sobre a segurança e qualidade de seus produtos.

A contaminação microbiológica de superfícies que entrarão em contato com alimentos é uma preocupação contínua nas indústrias. Sob condições propícias, células bacterianas podem aderir às superfícies, colonizando-as. Desta forma, se tais microrganismos não forem completamente removidos, podem contribuir para a formação de biofilmes, que comprometerão a segurança e a qualidade do produto.

A avaliação do procedimento de higienização de equipamentos e utensílios que entram em contato direto com os alimentos é uma preocupação constante das indústrias, que necessitam de resultados rápidos para garantir a qualidade dos produtos processados e a segurança aos consumidores. Os resultados dessa avaliação devem ser imediatamente repassados aos controladores de processos para que ações corretivas possam ser aplicadas, se necessário.

Métodos rápidos, sensíveis e precisos têm sido desenvolvidos para a enumeração de microrganismos e a detecção de resíduos orgânicos. Dentre estes se destaca a técnica de ATP bioluminescência, que tem como princípio a determinação da quantidade de ATP, seja de origem microbiana ou não, presente sobre a superfície avaliada. Esta técnica é uma ferramenta auxiliar na avaliação de procedimentos de higienização, aprovando ou não a utilização de determinada superfície que entrará em contato direto com alimento minutos antes do início do processamento.

Estudos têm demonstrado que alguns fatores podem interferir na medida de bioluminescência, por exemplo, íons e resíduos de detergentes. Da mesma forma, existe a possibilidade de os resultados serem afetados pela presença de resíduos orgânicos, como proteínas, gorduras e carboidratos aderidos às superfícies que entram em contato com alimentos, mascarando o resultado final da análise.

No Brasil, esta técnica tem sido aplicada e com tendência de ampliação de seu uso. No entanto, a interpretação do que se avalia nessa técnica nem sempre é realizada de forma adequada. Em função dessa consideração, este trabalho teve como objetivo avaliar a interferência de substâncias orgânicas, representadas por caseína, gordura animal e sacarose e também microrganismos, *Staphylococcus carnosus* e esporos de *Bacillus subtilis*, na determinação de bioluminescência, utilizando-se um luminômetro comercial de forma a simular a utilização da técnica de ATP bioluminescência como uma ferramenta no monitoramento de processos de higienização na indústria de alimentos. As análises foram realizadas com suspensões e soluções “in vitro” e aderidas a cupons de aço inoxidável AISI 304, nº 4, sendo cada componente avaliado de forma isolada e em combinações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Higienização na indústria de alimentos

O advento da globalização tem acarretado grandes e rápidas mudanças econômicas, sociais e políticas, ampliando oportunidades de negócios, mas provocando uma competitividade acirrada. As indústrias de alimentos, que se incluem neste contexto, têm processado uma quantidade de alimentos cada vez maior, na tentativa de suprir o mercado crescente, buscando sempre maior produtividade. Isso pode gerar diferentes problemas, como por exemplo, perdas pós-processamento ou diminuição da vida de prateleira se os métodos de higienização empregados não forem eficazes ou então, forem negligenciados.

Práticas higiênicas eficientes são necessárias em cada passo da cadeia produtiva dos alimentos. Nas indústrias de alimentos, o processo de higienização compreende as etapas de limpeza e sanitização, que são complementares (ANDRADE e MACÊDO, 1996; ROCHA et al., 1999).

A higienização é dividida em duas etapas bem definidas que devem ser respeitadas para obtenção de alimentos seguros. A limpeza, que tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por carboidratos, proteínas, gorduras e sais minerais, e a sanitização, que tem como objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos alteradores para níveis

considerados seguros (ANDRADE e MACÊDO, 1996; GIESE, 1991; ROCHA et al., 1999; GÂNDARA e OLIVEIRA, 2000; KRYSINSKI et al., 1992; MARRIOTT, 1995).

Muitas bactérias, no seu habitat natural, podem existir em duas formas diferentes: a) o estado planctônico, em que se apresentam de forma livre, e b) no estado sésil, em que estão aderidas a uma superfície (MARSHALL, 1992).

Em uma indústria de alimentos, quando o processo de higienização não é eficiente, resíduos orgânicos provenientes do processamento podem ficar aderidos às superfícies dos equipamentos ou utensílios. Segundo ZOTTOLA e SASAHARA (1994), um fluxo de nutrientes, matéria orgânica e inorgânica na superfície sólida leva à formação de uma camada condicionante em uma primeira fase, em uma próxima etapa, acontece a adesão de microrganismos nesta superfície e o início do crescimento celular com a formação de um biofilme bacteriano. O biofilme consiste de microrganismos aderidos a uma superfície por substâncias poliméricas extracelulares (COSTERTON et al., 1987). Outra definição estabelece que o biofilme é a agregação de células microbianas, que colonizam uma superfície, sendo esta agregação promovida por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios microrganismos (FLINT et al., 1997).

Os microrganismos possuem capacidade de se aderirem ao aço inoxidável, ao alumínio, ao vidro, à borracha, ao teflon, ao náilon, à fórmica, ao polipropileno e ao ferro forjado (SCHWACH e ZOTTOLA, 1984; SUÁREZ e FERREIRÓS, 1991; SASAHARA e ZOTTOLA, 1993; JEONG e FRANK, 1994; KUMAR e ANAND, 1998).

A implementação de um programa global de higienização combinado a um sistema de prevenção, tal como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), pode ajudar a assegurar a produção de alimentos livres de microrganismos patogênicos e ou riscos de contaminação química (GIESE, 1991). Um programa de higienização efetivo aumenta as chances de a indústria atender as normas exigidas pela legislação.

Nas indústrias de alimentos, a multiplicação e a sobrevivência de microrganismos deve ser controlada nas matérias-primas, nas superfícies de equipamentos e utensílios, nos ambientes de processamento, em manipuladores, em embalagens, na distribuição e no produto final. O

monitoramento correto dos procedimentos de higienização permite um controle microbiológico eficiente e além disso, registros comprovam se um processo ou manipulação em um ponto crítico de controle está em conformidade com o limite crítico estabelecido no plano APPCC.

Geralmente, o tempo necessário para se ter em mãos os resultados de testes microbiológicos tradicionais é demasiadamente longo para servir como forma de monitoramento (GIOVA, 1997), podendo variar entre 24 e 72 horas. Tais técnicas, apenas fornecem valores numéricos de contaminação, não fornecendo informações adicionais com respeito à presença ou não de resíduos de alimentos que possam ter permanecido nas superfícies de trabalho após a higienização, tornando-se então possíveis fontes de contaminação, diminuindo a eficiência dos sanitizantes (HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997; VELAZQUEZ e FEIRTAG, 1997). Desta forma, a detecção de um desvio de uma especificação microbiológica por uma técnica que ofereça resultado em tempo real permite que seja realizada uma ação corretiva adequada. É dessa idéia que vem a necessidade do desenvolvimento de técnicas rápidas e confiáveis para auxiliar no monitoramento de processos de higienização e dentre as estudadas encontra-se a técnica de ATP bioluminescência.

2.2. Técnica de ATP bioluminescência

Todas as células vivas, tais como células da pele, do sangue, de plantas, uma variedade de alimentos e microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras contêm moléculas de adenosina trifosfato (ATP). O ATP é um nucleotídeo utilizado pelas células como fonte de energia, sendo que sua quantidade na célula é geralmente constante (THORE et al., 1975) e desaparece duas horas após a morte celular (MUNSON et al., 1976). O uso desta molécula para medir a qualidade bacteriológica fundamenta-se no fato de que todas as células vivas contêm ATP o que não ocorre com células não viáveis.

KODAKA et al. (1996) determinaram a concentração de 10^{-17} mol de ATP por célula vegetativa e 10^{-21} mol de ATP por esporo bacteriano, o que representa de 0,1 a 5,5 fentogramas (10^{-15} g) por célula, com teores médios de

um fentograma. Várias são as razões para a variação deste conteúdo entre as bactérias, como por exemplo, a fase do crescimento celular, com concentração mais baixa na fase estacionária (POULIS et al., 1993). Por outro lado, o conteúdo intracelular pode diminuir em resposta a alguma condição de estresse, como resultado da limitação de nutrientes, alterações no pH e presença de inibidores (KODAKA et al., 1996).

A técnica de bioluminescência determina a presença do ATP, seja de origem microbiana ou não, sendo que a determinação da quantidade desta molécula na célula microbiana é influenciada pela forma de extração do mesmo. Outra limitação do método é a necessidade de um número mínimo de microrganismos presentes na amostra (ADAMS e HOPE, 1989). A sensibilidade de alguns equipamentos comumente utilizados exige um número mínimo entre 10^4 Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de amostra (UFC.mL^{-1}) e 10^5 UFC.mL^{-1} , por grama de amostra (UFC.g^{-1}) ou por cm^2 da superfície avaliada (UFC.cm^{-2}) para que a presença de ATP seja detectada. Muito embora, o limite de detecção de 10^2 UFC.cm^{-2} para alguns sistemas de monitoramento por ATP bioluminescência tem sido relatado na literatura (CORBITT et al., 2000 e DAVIDSON et al., 1999).

O método de bioluminescência descrito por STANNARD e WOOD (1983) permitiu obter resultados em 20 a 25 minutos comparados com 24 a 48 horas para uma contagem de colônias convencional, estabelecendo uma relação linear entre o logaritmo decimal de ATP microbiano e o logaritmo decimal da contagem microbiana, para uma faixa entre 10^5 UFC.g^{-1} e 10^9 UFC.g^{-1} .

O princípio da técnica consiste em remover o ATP de uma superfície ou de uma amostra líquida, utilizando para isto um kit contendo um swab e agentes químicos. O nucleotídeo pode ser de origem microbiana ou não microbiana, podendo estar na forma livre ou dentro dos microrganismos. O swab contendo a amostra é colocado em contato com o complexo enzimático luciferina/luciferase, extraído da cauda do vaga-lume da espécie *Photinus pyralis* ou de peixes abissais (GRIFFITHS, 1993; GIESE, 1991; VELAZQUEZ e FEIRTAG, 1997). A enzima luciferase utiliza a energia química contida na molécula de ATP para promover a descarboxilação oxidativa da luciferina,

resultando na emissão de luz, sendo que para cada molécula de ATP um fóton de luz é emitido (Figura 1) (HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997; GIESE, 1991).

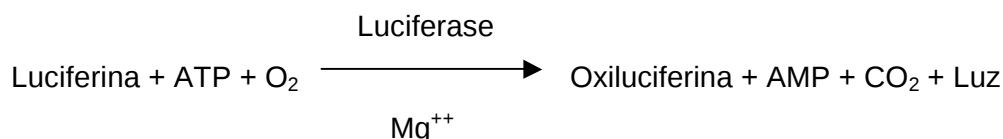


Figura 1 – Esquema da reação entre adenosina trifosfato (ATP) e o complexo luciferina/luciferase, tendo luz como um dos produtos.

Fonte: HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997

Como o ATP está presente tanto em organismos vivos quanto em resíduos orgânicos e, ainda, na forma livre, a determinação de ATP microbiano pode ser realizada de formas diferentes dependendo da metodologia empregada. Em uma destas formas o ATP é determinado pela separação da bactéria do resíduo orgânico seguida de extração e a quantificação do nucleotídeo presente na amostra. Uma outra forma consiste em determinar o ATP microbiano por uma extração seletiva e destruição enzimática do ATP não microbiano, seguida pela extração e quantificação do ATP microbiano. Os reagentes empregados nestas análises estão disponíveis comercialmente, como NRS[®], Lumac e o NAS[®] (KENNEDY e OBLINGER, 1985; TYDRICH, 1996; STANNARD e WOOD, 1983). Alguns pesquisadores têm aplicado filtração ou centrifugação para separar os microrganismos da amostra do alimento, medindo assim apenas o ATP microbiano.

Os instrumentos disponíveis para medir a luminescência são fotômetros sensíveis à emissão de luz. A instrumentação é relativamente simples, em que a maior parte dos instrumentos utilizados é baseada na detecção de luz por fotomultiplicadores. A amostra é colocada em uma câmara escura para proteger o fotomultiplicador e o amplificador de luz externa. Os resultados são usualmente expressos em unidades relativas de luz (URL) ou logaritmo decimal

das unidades relativas de luz (LURL) (HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997; COMBRUGGE e WAES, 1991).

O número de URL determinado pela técnica de ATP bioluminescência é afetado por certos fatores que causam redução na emissão nos fótons. O pH ótimo para a reação química é de 7,75, sendo que em valores acima ou abaixo há diminuição da produção de luz. A temperatura ótima é de 25°C, de modo que temperaturas mais elevadas podem inativar a luciferase, enquanto temperaturas mais baixas diminuem a velocidade de reação de formação de luz. Além disso, a turbidez e a cor das amostras, por exemplo, no caso de análise de água, também causam diminuição na produção de luz (TYDRICH, 1996; COMBRUGGE e WAES, 1991).

BELL et al. (1996), utilizando um luminômetro comercial, determinaram que o valor de 5700 URL, com nível de 95% de confiança, poderia ser utilizado como um limite qualitativo para classificação de leite cru no Reino Unido. Este valor de URL correspondia a 10^5 UFC.mL⁻¹.

A técnica de ATP bioluminescência foi utilizada com sucesso para detectar a presença de ATP em superfícies cirúrgicas na área odontológica como um indicador da presença de contaminação por saliva ou microrganismos e avaliar a eficiência dos procedimentos da rotina de higienização. Tais rotinas são difíceis de serem monitoradas pelo tempo e trabalho despendido na realização das técnicas microbiológicas. Esse monitoramento é fundamental no controle contaminações cruzadas entre pacientes ou entre os profissionais envolvidos na cirurgia, como os dentistas e auxiliares. A atenção sobre o controle de contaminação cruzada em cirurgia oral aumentou principalmente com o advento da AIDS (vírus HIV), embora uma grande preocupação seja o vírus da Hepatite B (HBV). Tais vírus estão presentes não somente no sangue, mas também em secreções como a saliva. Embora a maior preocupação com a transmissão do HIV e HBV dentro de cirurgias orais seja com acidentes perfuro-cortantes, a transmissão envolvendo superfícies contaminadas não pode ser descartada (DOUGLAS e ROTHWELL, 1991).

Alguns resultados encontrados na literatura são discrepantes no que diz respeito à correlação entre o número de URL, realizadas por luminômetros, e contagens de UFC, quando foi avaliada a carga microbiana em mãos. MARENA et al. (2002) relataram uma correlação significativa entre número de

URL e UFC. Já LARSON et al. (2003) não encontraram correlação entre esses valores.

A técnica de ATP bioluminescência tem sido utilizada para avaliar a qualidade microbiológica de produtos alimentícios, tais como, leite e derivados, bebidas, carnes e derivados, água e vegetais. Tem sido usada também para a detecção da presença de bactérias, avaliação do processo de limpeza e desinfecção tanto em indústria de alimentos como em hospitais e indústria farmacêutica (CORBITT et al., 2000; GÓMEZ, 1997; GRIFFITHS et al., 2000; GRIFFITHS, 1993; VELAZQUEZ e FEIRTAG, 1997; KENNEDY e OBLINGER, 1985; TYDRICH, 1996). Alguns estudos têm indicado diferenças na sensibilidade e reprodutibilidade entre as várias marcas comerciais desses equipamentos (COLQUHOUN et al., 1998), alguns deles disponíveis no Brasil.

Algumas vantagens podem ser citadas com respeito à técnica de ATP bioluminescência em relação às técnicas microbiológicas tradicionais: i) é capaz de detectar a presença de microrganismos e resíduos de processamento; ii) é uma técnica simples e fácil de usar, demandando pequena necessidade de laboratório; iii) pode ser usada como uma ferramenta de treinamento para demonstrar a presença de contaminação, seja de origem orgânica ou microbiológica, sendo um fator de grande relevância, pois a avaliação imediata do procedimento de higienização de uma superfície pode ter efeito positivo na motivação e performance das pessoas envolvidas no processo.

Apesar de tudo, algumas desvantagens da técnica de ATP bioluminescência podem ser constatadas: i) não é seletiva com relação à presença ou ausência de microrganismos patogênicos, somente a contaminação na amostra em níveis de ATP total; ii) apenas partes acessíveis dos equipamentos podem ser analisadas; iv) a presença de detergentes e outros agentes químicos pode interferir na reação de bioluminescência e iii) o custo associado à técnica ainda é alto para pequenas indústrias (HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997; TYDRICH, 1996). Pode ser citada também a sensibilidade dos equipamentos, uma vez que é necessária uma quantidade mínima de microrganismos para aplicação da técnica.

A principal vantagem do monitoramento dos níveis de ATP sobre as técnicas convencionais de cultivo de microrganismos é o tempo de obtenção

dos resultados. São necessários dias para finalização de métodos de cultivo enquanto a análise de ATP necessita de alguns minutos. Desta forma, programas de higienização podem ser monitorados em tempo real, e se os níveis de ATP encontrados estiverem acima dos limites preestabelecidos como aceitáveis, uma nova higienização da área amostrada deve ser iniciada imediatamente. O uso da análise de ATP para monitorar níveis de higienização não substitui as técnicas microbiológicas tradicionais, que são utilizadas para detectar a presença de microrganismos específicos. Estas duas técnicas são complementares no processo de monitoramento de superfícies (COLQUHOUN et al., 1998).

GREEN et al. (1999) avaliaram o efeito de nove agentes químicos de limpeza e sanitizantes comerciais na quantificação de ATP pela técnica de bioluminescência, usando ATP de diferentes fontes. Os autores concluíram que os sanitizantes e agentes de limpeza podem acarretar alterações no número de URL devido a reações com os componentes da reação de bioluminescência, como a enzima luciferase, o cofator luciferina ou o substrato ATP.

VELAZQUEZ e FEIRTAG (1997) avaliaram o efeito de hipoclorito de sódio comercial e um composto quaternário de amônia, em diversas concentrações, em amostras contendo *Escherichia coli* O157:H7 no número de URL. Nas maiores concentrações houve uma redução na concentração do microrganismo. Nas outras concentrações testadas, onde não foi detectado efeito sobre o microrganismo, observou-se um ligeiro aumento no número de URL. Os autores sugerem que caso esses microrganismos estivessem presentes em uma superfície de processamento de alimentos, estas seriam consideradas em condições higiênicas insatisfatórias pela técnica do ATP bioluminescência, e um novo processo de higienização seria realizado.

No estudo realizado por COSTA (2001), observou-se uma divergência nos resultados obtidos quando se compararam as técnicas de ATP bioluminescência e contagem bacteriana na avaliação das condições de potabilidade de água, adesão bacteriana em superfícies de aço inoxidável e polietileno e o procedimento de higienização em superfícies de equipamentos e utensílios de uma linha de pasteurização de leite. Em uma de suas conclusões, o autor sugere que a técnica de bioluminescência não foi apropriada para avaliar a presença de esporos de *Bacillus sporothermodurans* em superfícies

de aço inoxidável e polietileno, sendo que os resultados obtidos com a técnica de ATP bioluminescência classificaram tais superfícies como em condições higiênicas satisfatórias, enquanto que a contagem bacteriana classificou-as como insatisfatórias. Este resultado está em acordo com os obtidos por AKUTSU (2001) e BAKER et al. (1992), que sugerem que esporos bacterianos não apresentam metabolismo, níveis de ATP ou transporte de elétrons detectáveis, não tendo, portanto, energia suficiente para realizar a reação de formação de luz.

WEN et al. (2001) constataram que cátions e ânions alteraram o número de URL nas concentrações comumente encontradas em extratos de ATP provenientes de solo quando foi utilizado um kit comercial para análise de ATP. Concentrações de 1 mM de cátions reduziram o número de URL, apresentando a seguinte ordem de classificação: $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Na}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$. Também, concentrações de 6,4 mM ânions reduziram a medida de URL, de acordo com a seguinte classificação: $\text{PO}_4^{3-} > \text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$. Foi avaliado, ainda, o efeito de três diferentes formas de EDTA, e a ordem na redução na medida de bioluminescência foi : EDTA-ácido > Na-EDTA > Mg-EDTA.

VANNE et al. (1996) concluíram que o êxito na combinação de programas de APPCC e métodos microbiológicos rápidos pode ajudar indústrias de alimentos a encontrar novos caminhos para obter resultados seguros de forma mais eficiente e de garantir a segurança alimentar.

2.3. Substâncias orgânicas

Como já foi mencionado, alguns fatores podem influenciar nos resultados obtidos com a técnica de ATP bioluminescência, de forma a contribuir negativamente no seu potencial de utilização como uma ferramenta no monitoramento de procedimentos de higienização. Dentre esses fatores, um que é pouco estudado, e conseqüentemente pouco relatado em literatura é a interferência que resíduos orgânicos como proteína, lipídeos e carboidratos, oriundos do processamento de alimentos de origem animal e vegetal, podem causar na determinação de ATP pela técnica de bioluminescência.

Na indústria de alimentos, diversas superfícies para processamento são passíveis de apresentar formação de aderência e, ou formação de biofilmes de origem bacteriana (SILVA, 2000). Fatores como características do microrganismo, do material aderente e do meio que envolve o microrganismo podem influenciar a adesão bacteriana (TROLLER, 1993). Uma teoria para o processo de adesão sugere a existência de cinco etapas diferenciadas, dentre elas estão o transporte de nutrientes e matéria orgânica e inorgânica para a superfície sólida e a formação de uma camada de nutrientes orgânicos e inorgânicos (CHARACKLIS e COOKSEY, 1983; ZOTTOLA, 1994, 1997). Segundo COWELL et al. (1999), a limitação de nutrientes altera o perfil da adesão de *Pseudomonas aeruginosa*.

Essas substâncias orgânicas são revisadas de uma forma sucinta a seguir.

2.3.1. Lipídeos

Os lipídeos constituem um amplo grupo de compostos, em geral solúveis em solventes orgânicos e pouco solúveis em água (NAWAR, 1993). São os principais componentes do tecido adiposo e juntamente com as proteínas e os carboidratos são os principais componentes estruturais das células vivas (NAWAR, 1993; BOBBIO e BOBBIO, 1995). Os lipídeos encontram-se nos espaços intermuscular e intramuscular, no tecido adiposo, no tecido nervoso e no sangue, representando de 12 a 20 % do peso vivo de um suíno (PRICE e SCHWEIGERT, 1994). Existe uma relação inversa entre a porcentagem de tecido adiposo na carcaça animal e a porcentagem de músculos (LINDEN e LORIENT, 1994).

Os lipídeos ocorrem em quase todos os tipos de alimentos, e a maioria deles, aproximadamente 90 %, é encontrada na forma de triglicerídeos. Além dos triglicerídeos, os alimentos também possuem outros tipos de lipídeos, como fosfolipídeos, glicolipídeos, esfingolipídeos, lipoproteínas, dentre outros (ARAÚJO, 1999). Os triglicerídeos estão presentes nas células adiposas ou adipócitos que compõem o tecido adiposo do animal, contêm uma grande variedade de ácidos graxos embora somente cinco ou seis estão presentes em maiores proporções, sendo que a composição e a combinação desses ácidos

graxos nos triglicerídeos determinam as características físicas dos lipídeos (HAMILTON, 1995). Os ácidos graxos naturais presentes nos alimentos possuem cadeia linear e números pares de carbono, os quais podem ser saturados ou insaturados com até seis duplas ligações (ARAÚJO, 1999).

A composição de ácidos graxos nos triglicerídeos do tecido adiposo de suínos varia de acordo com o local onde este tecido está localizado: subcutâneo externo e interno, traseiro, barriga e outros. O componente majoritário nos depósitos de gordura nos mamíferos é o ácido oléico (WOOD et al., 1986; MAW et al., 2003). Outros ácidos de importância são: palmítico, palmitoléico, esteárico e o linoléico (HAMILTON, 1995).

O termo gordura animal compreende usualmente todas as espécies de lipídeos, incluindo triglicerídeos, a forma predominante, fosfolipídeos, esteróis e ésteres de esteróis e outros (PRICE e SCHWEIGERT, 1994). São formadas pelas gorduras de reserva dos animais domésticos (banha e sebo), contendo quantidades razoáveis de triglicerídeos totalmente saturados e têm pontos de fusão relativamente altos (NAWAR, 1993).

As gorduras são insolúveis em água e solúveis em agentes alcalinos e tensoativos, sendo de difícil remoção das superfícies de processamento de alimentos comumente utilizadas nas indústrias, sendo necessário transformações químicas específicas para removê-las, tais como a saponificação e, ou, a emulsificação (MARRIOT, 1995). O processamento de alimentos e os procedimentos de higienização que empregam calor podem ocasionar a polimerização dessas gorduras (MARRIOT, 1995). A deposição de gordura nas superfícies após o processamento de alimentos aliada a dificuldade de sua remoção podem facilitar a adesão de microrganismos.

A banha e o sebo comestíveis são elaborados principalmente por um processo de fusão com vapor. O consumo direto per capita de banha tem diminuído, sendo que a utilização de banha de porco tem se mantido por ser empregada em outros alimentos e outros produtos não alimentícios (PRICE e SCHWEIGERT, 1994).

2.3.2 Carboidratos

Carboidratos constituem um dos principais grupos de compostos orgânicos encontrados na natureza, e juntamente com as proteínas formam os constituintes principais do organismo vivo, além de serem a mais abundante e econômica fonte de energia para o homem (BOBBIO e BOBBIO, 1995). Contêm carbono, hidrogênio e oxigênio em sua composição $[C_x(H_2O)_y]$ e representam em torno de 80 % do aporte calórico da humanidade, principalmente o amido e a sacarose. Entre os mais importantes tipos de carboidratos em alimentos estão os açúcares, dextrinas, amido, celulose, hemicelulose, pectinas e algumas gomas (WHISTLER e DANIEL, 1993).

Os carboidratos são classificados em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os oligossacarídeos são aqueles cuja hidrólise total resultam até dez unidades de monossacarídeos, como por exemplo a sacarose, que é um dissacarídeo e polímeros de alto peso molecular, formados por um grande número de monossacarídeos, são denominados polissacarídeos (BOBBIO e BOBBIO, 1995). Dissacarídeos comuns em alimentos são: sacarose (de cana de açúcar ou beterraba), maltose (amido) e lactose (leite) (WHISTLER e DANIEL, 1993).

WHISTLER e DANIEL (1993) listam algumas características para os açúcares como a glicose, frutose, maltose, sacarose e lactose: i) são usados por seu poder adoçante; ii) são solúveis em água, formando xaropes; iii) formam cristais quando a água é evaporada de suas soluções (este é o caso da recuperação da sacarose da cana de açúcar); iv) são fontes de energia; v) são fermentados por microrganismos; vi) em altas concentrações inibem o desenvolvimento de microrganismos; vii) escurecem ou caramelizam com o emprego de calor.

Os carboidratos são solúveis em água sendo fácil sua remoção das superfícies de processamento de alimentos comumente utilizadas nas indústrias (MARRIOT, 1995). O processamento de alimentos e os procedimentos de higienização que empregam calor podem ocasionar a caramelização desses compostos orgânicos (MARRIOT, 1995). A deposição de carboidrato nas superfícies após o processamento de alimentos, ocasionada

por falhas nos procedimentos de higienização, pode facilitar a adesão de microrganismos.

A sacarose é um dissacarídeo não redutor, não reagindo com solução de Fehling ou solução amoniacal e íons de prata, nem sofre mutarrotação, e pode ser considerado o mais importante dissacarídeo, tanto pela quantidade e frequência com que é encontrado na natureza, como pela sua importância na alimentação humana (BOBBIO e BOBBIO, 1995). Ao entrar no intestino delgado, é hidrolisada por uma enzima invertase na parede intestinal, resultando em seus monômeros formadores, a D-glicose e a D-frutose (WHISTLER e DANIEL, 1993).

A sacarose está presente em pequenas quantidades na maior parte dos alimentos vegetais naturais, sendo a maior parte de sua ingestão proveniente de alimentos adicionados deste açúcar, como refrigerantes, refrescos, bolos, biscoitos, cereais matinais, leite em pó desnatado e outros (WHISTLER e DANIEL, 1993).

A sacarose, a glicose, o amido de milho, lactose e o sorbitol são os principais edulcorantes utilizados nos produtos cárneos, conferindo sabor característico ao produto, mascarando o sabor do sal e, em alguns casos, auxiliando na retenção de água, devido ao poder higroscópico dos açúcares, sendo empregados em concentrações que variam entre 2 a 3 % (PRICE e SCHWEIGERT, 1994).

2.3.3. Caseína

A principal proteína existente no leite fresco é a caseína, uma fosfoproteína que se encontra na forma de sal de cálcio coloidal (BOBBIO e BOBBIO, 1995), constituindo-se na maior parte da matéria nitrogenada do leite. As propriedades físico-químicas do leite são determinadas, em grande parte, pelas propriedades do complexo de caseína (ROBINSON, 1987). Este complexo é denominado micela, que junto com a gordura dão a cor branca do leite (BOBBIO e BOBBIO, 1995). É encontrada no leite, em média, na proporção de 3 %, constituindo aproximadamente 80 % das proteínas totais (BEHMER, 1995; SWAISGOOD, 1993).

O tamanho do complexo de caseína varia de 30 a 300 nm de diâmetro (SWAISGOOD, 1993), apresentando baixa solubilidade a pH 4,6. As micelas são formadas por submicelas, grosseiramente esféricas, contendo agregados de várias moléculas de caseína, com a seguinte relação: [α S₁-caseína : α S₂-caseína : (β + γ)-caseína : k-caseína = 4:1:4:1,3], mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. Fosfato de cálcio amorfo liga as submicelas entre si, com participação de ésteres fosfatos (WALSTRA, 1990). Desta forma, quase todas as regiões nas moléculas de caseína têm mobilidade restrita. A porção carboxi-terminal da k-caseína está, predominantemente, presente como filamentos flexíveis, orientados para o meio externo. Nem todas as micelas possuem k-caseína (WALSTRA, 1990).

A caseína pode ser precipitada pela ação da renina, uma enzima encontrada no suco gástrico, e também por ácidos (BOBBIO e BOBBIO, 1995), sendo estáveis em temperaturas próximas a 200°C (ARAÚJO, 1999). Estes precipitados de caseína constituem a base para fabricação do queijo, que conseqüentemente retém a maioria das proteínas do leite (SWAISGOOD, 1993).

Assim como os lipídeos, as proteínas são insolúveis em água e solúveis em agentes alcalinos, sendo de difícil remoção das superfícies de processamento de alimentos comumente utilizadas nas indústrias, sendo necessário transformações químicas específicas para removê-las, tais como a solubilização (MARRIOT, 1995). O processamento de alimentos e os procedimentos de higienização que empregam calor podem ocasionar a desnaturação das proteínas (MARRIOT, 1995). Além da alcalinidade, são fatores que afetam a remoção destes compostos a temperatura elevada, até 80 °C, e o tempo de contato com os agentes alcalinos (ANDRADE e MACÊDO, 1996). A deposição de proteína nas superfícies após o processamento de alimentos aliada à dificuldade de sua remoção pode facilitar a adesão de microrganismos.

Proteínas do leite têm propriedades emulsificantes excelentes, e uma das mais utilizadas como ingredientes no processamento de alimentos é a caseína (DICKINSON, 1999). Conjugados de proteína (caseína) e polissacarídeos (maltodextrinas) combinam propriedades emulsificantes das proteínas e o efeito estabilizante dos polissacarídeos, com a vantagem de ser

uma alternativa como ingredientes, pois, são naturais, não tóxicos, baratos e abundantes (SHEPERD et al., 2000).

2.4 Microrganismos: *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus carnosus*

A espécie *Bacillus subtilis* é descrita como bactéria móvel, aeróbia, Gram-positiva, possui forma de bastonete, com flagelos peritríquios e que ocorre em diversos ambientes, podendo, em condições adversas, produzir esporos que permitem a sua sobrevivência (SNEATH, 1986). A morfologia de suas colônias varia desde formas irregulares a arredondadas com superfície opaca, podendo apresentar rugosidades e uma coloração creme ou marrom (ROBINSON, 1987). Seu habitat típico é o solo, mas encontram-se amplamente distribuídos na natureza, podendo contaminar os alimentos por diferentes vias, tais como o ar e água.

Este microrganismo é associado à produção de viscosidade ou limo em leite cru ou pasteurizado, sendo também considerado como responsável pela coagulação enzimática do leite (JAYNE-WILLIAMS e FRANKLIN, 1960).

O esporo bacteriano é uma formação intracelular que ocorre em alguns gêneros de bactérias tais como, *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* e *Oscilospira* que abrangem cerca de 115 espécies que têm a capacidade genética de apresentarem essa forma de resistência em condições adversas (DOORES, 1983; SNEATH, 1986). O esporo bacteriano apresenta especial interesse para a indústria de alimentos uma vez que é muito resistente aos tratamentos térmicos (GOMBAS, 1983), irradiação, dessecação, vácuo, congelamento e agentes químicos (COOK e PIERSON, 1983; FOEGEDING, 1983; STEVENSON e SHAFER, 1983). A conversão dos esporos em células vegetativas envolve quatro etapas bem estabelecidas: a ativação, a germinação, o crescimento pós-germinação e a multiplicação (COOK e PIERSON, 1983; SNEATH, 1986).

Staphylococcus carnosus apresenta-se na forma de cocos Gram-positivos, com o diâmetro da colônia maior do que 5 µm. É anaeróbio facultativo, possuindo metabolismo respiratório e fermentativo. Apresenta temperatura de crescimento na faixa de 15 a 45°C, com ótimo entre 30 e 37°C.

São bactérias capazes de crescer em meio com 10 a 15% de NaCl. O citocromo c está presente, mas, é oxidase negativo. Reduz nitrato a nitrito, e é coagulase negativa (HOLT et al., 1993).

Algumas espécies do gênero *Staphylococcus* são utilizadas como cultura starter em produtos cárneos fermentados, como salames e presuntos (SONDERGAARD e STAHNKE, 2002). Seu uso é devido, principalmente, a sua atividade nitrato redutase, relacionada à aceleração e estabilização da cor, e também por sua habilidade em produzir compostos envolvidos na formação de sabor em produtos cárneos (MONTEL et al., 1998). O uso de cultura starter pode ser decisivo no sabor dos produtos, uma vez que a atividade de enzimas de microrganismos, da própria carne ou uma combinação de ambas têm papel importante na formação bioquímica de sabor (SONDERGAARD e STAHNKE, 2002).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa - MG.

3.1. Quantificação de proteína, lipídeo e carboidrato em um embutido fermentado cárneo

Para quantificação de proteína, lipídeo e carboidrato em um alimento processado foi utilizado um modelo que possuísse em sua composição todas as substâncias orgânicas avaliadas. Este produto foi fabricado no Laboratório de Processamento de Carnes da Universidade Federal de Viçosa, e consistiu em um embutido fermentado cárneo, em cuja formulação foi empregado carne, leite em pó, açúcar e gordura suína.

A estimativa do percentual de proteínas, lipídeos e carboidratos no embutido fermentado cárneo foi obtida de amostras do produto coletadas logo após sua fabricação, que foram submetidas às seguintes análises químicas e microbiológicas:

- a) determinação de proteínas totais, utilizando o Método micro Kjeldahl 960.52 (AOAC, 2000), com fator de conversão 6,25;

- b) teor de lipídeos, determinado pelo Método Modificado de Extração Soxhlet 13.032 e 10.033 (AOAC, 2000);
- c) umidade, determinada pelo método direto de secagem em estufa (Instituto Adolfo Lutz, 1985);
- d) conteúdo de cinzas, determinado pela incineração da amostra em alta temperatura (AOAC, 2000);
- e) massa de carboidratos determinada pela diferença entre a massa inicial da amostra em gramas e a soma do conteúdo de proteínas totais, lipídeos, umidade e cinzas em gramas:

$$C = MI - (P + L + U + Ci)$$

C = carboidratos em gramas; MI = massa inicial da amostra em gramas;
P = proteínas totais em gramas; L = lipídeos em gramas; U = umidade;
Ci = cinzas em gramas.

- f) avaliação microbiológica: Foram realizadas a contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas, expressa em UFC.g⁻¹ (SWANSON et al., 1992) e a contagem de fungos filamentosos e leveduras, expressa em UFC.g⁻¹ (MISLIVEC et al., 1992), segundo metodologia proposta pela American Public Health Association (APHA).

De acordo com as análises químicas, o embutido fermentado cárneo apresentou a seguinte composição por 100 gramas de amostra: 15 g ou 15 % de proteína, 30 g ou 30 % de lipídeo, 2,5 g ou 2,5 % de carboidrato, 49,5 g ou 49,5 % de umidade e 3 g ou 3 % de cinzas. Tais informações foram utilizadas na determinação das concentrações das suspensões usadas nos experimentos. As análises microbiológicas das amostras apresentaram média de 1,9x10⁶ UFC.g⁻¹ de bactérias aeróbias mesófilas e 7,3x10⁴ UFC.g⁻¹ de fungos filamentosos e leveduras.

3.2. Quantificação do resíduo orgânico em superfície de aço inoxidável após contato com massa cárnea

A quantidade de resíduo de alimento em uma superfície de processamento, após ser submetida a um procedimento de higienização, foi estimada simulando o processamento de um produto cárneo.

Para isto, preparou-se uma amostra de massa cárnea usando-se 500 g de carne suína e 500 g de toucinho suíno, moídos em um picador de carne (C.A.F), usando-se um disco com furos de 5 milímetros de diâmetro. Posteriormente, três cupons de aço inoxidável AISI 304, nº 4, de 10 cm de comprimento, 10 cm de largura e 1 mm de espessura, devidamente esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave, foram colocados em contato com essa massa cárnea por 10 minutos.

Os cupons foram submetidos a um procedimento de higienização, que consistiu de esfregação manual por cerca de 1 minuto com esponja comercial dupla face, uma camada de poliuretano e outra de fibra sintética, embebida em detergente neutro à base de agentes tensoativos (Lever Industrial). Os cupons foram enxaguados com água em abundância e posteriormente secos à temperatura entre 20 e 25°C.

O resíduo não eliminado no procedimento de higienização foi removido da superfície usando-se chumaços de algodão previamente pesados em balança analítica (Sauter, modelo 414/12) com precisão de 0,0001 g. O algodão, preso a uma pinça metálica esterilizada, foi friccionado na superfície dos cupons por duas vezes na direção de cada diagonal com movimento de vai-e-vem. Após a remoção do resíduo, o algodão foi novamente pesado. A quantidade de resíduo aderida à superfície foi determinada pela diferença da massa do algodão, antes e após a sua fricção, expressa em $\mu\text{g.cm}^{-2}$ de resíduo.

De acordo com o procedimento descrito acima os cupons avaliados após higienização apresentaram $47 \mu\text{g.cm}^{-2}$ de resíduo orgânico.

3.3. Preparo de suspensões e soluções de substâncias orgânicas e microrganismos para uso em análises da interferência na determinação de ATP pela técnica de bioluminescência

Foram avaliados a interferência de três substâncias orgânicas puras e dois microrganismos na técnica de ATP bioluminescência: α -caseína P.A. (Sigma), gordura animal (banha de porco, produto comercial da Sadia) e sacarose P.A. (Vetec), *Staphylococcus carnosus* e esporos de *Bacillus subtilis*.

As análises foram realizadas com suspensões e soluções “in vitro” e aderidas à superfície de cupons de aço inoxidável AISI 304, nº4.

3.3.1. Preparo de suspensões e soluções de substâncias orgânicas

A partir da quantidade de resíduo orgânico em superfície de aço inoxidável após contato com massa cárnea determinada no item 3.2 e dos percentuais de proteína, lipídeo e carboidrato do embutido fermentado cárneo determinados no item 3.1 foram calculadas as concentrações de caseína, lipídeo e sacarose das suspensões e soluções a serem testadas.

Concentrações em $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ foram determinadas para avaliação das substâncias orgânicas aderidas aos cupons de aço inoxidável, multiplicando-se o valor $47 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de resíduo orgânico em superfície e os respectivos percentuais de cada substância na composição do embutido fermentado cárneo. Para o preparo das suspensões e soluções levou-se em consideração a massa total de cada substância orgânica relativa a área total de cada cupom de aço inoxidável (100 cm^{-2}), de forma que toda essa massa estivesse contida em uma alíquota de 1 mL.

Para avaliação “in vitro” foi necessário realizar um ajuste nos valores para que fosse levado em consideração a alíquota de 0,1 mL de amostra coletada na amostragem com o kit AQUA-TRACE TOTAL (BIOTRACE, 2000).

No item 3.2 foi determinado:

$47 \mu\text{g}$ de resíduo orgânico — 1 cm^{-2} de cupom de aço inoxidável

Que é equivalente a:

$4700 \mu\text{g}$ de resíduo orgânico — 100 cm^{-2} de cupom de aço inoxidável

ou

4,7 mg de resíduo orgânico — 100 cm^{-2} de cupom de aço inoxidável
O resíduo orgânico de um cupom (100 cm^{-2}) foi coletado pelo kit, logo:
4,7 mg de resíduo orgânico — 0,1 mL de alíquota no kit AQUA-TRACE
TOTAL

Portanto:

47 mg de resíduo orgânico — 1 mL de suspensão ou solução de
substância orgânica

Assim, o valor de referência utilizado para calcular a concentração inicial das suspensões e soluções foi 47 mg.mL^{-1} , que foi multiplicado pelos respectivos percentuais de cada substância na composição do embutido fermentado cárneo. Além disso, foram preparadas suspensões e soluções com concentrações 50 % maiores e 50 % menores do que a concentração inicial.

3.3.1.1. Preparo de suspensão de caseína

Foi preparada suspensão estoque de α -caseína (Sigma), esterilizada por filtração em membrana com poros de $0,20\text{ }\mu\text{m}$ (Sartorius), utilizando sistema de filtração Millipore e armazenada em ultra freezer a -80°C . A partir desta suspensão estoque foram preparadas todas as suspensões para teste.

Para a avaliação da caseína aderida aos cupons de aço inoxidável multiplicaram-se os valores de $47\text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$ de resíduo orgânico em superfície e 15 % de proteína no embutido fermentado cárneo, obtendo-se concentração de $7,0\text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$ de caseína. Considerando-se a área de cada cupom e a alíquota de distribuição foi preparada uma suspensão de $0,7\text{ mg.mL}^{-1}$ de caseína.

Para o preparo das suspensões para a análise “in vitro” multiplicaram-se os valores de 47 mg.mL^{-1} de resíduo orgânico em superfície e 15 % de proteína no embutido fermentado cárneo, obtendo-se a concentração de $7,0\text{ mg.mL}^{-1}$ de caseína, além das concentrações de $10,5\text{ mg.mL}^{-1}$ e $3,5\text{ mg.mL}^{-1}$ de caseína, 50 % maior e 50 % menor, respectivamente.

3.3.1.2. Preparo de suspensão de lipídeo

Foi preparada suspensão estoque de banha de porco (produto comercial da Sadia) fundida em banho-maria à temperatura de 45°C durante 30 minutos. Essa porção de banha foi retirada de forma asséptica com o auxílio de espátulas metálicas esterilizadas, e acondicionada em frasco de vidro esterilizado. Esse procedimento foi realizado imediatamente antes do início do experimento, e o material fundido foi mantido a 30°C até o momento do uso.

Para a avaliação de lipídeo aderido aos cupons de aço inoxidável multiplicaram-se os valores de 47 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de resíduo orgânico em superfície e 30 % de lipídeo no embutido fermentado cárneo, obtendo-se concentração de 14,0 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de lipídeo. Considerando-se a área de cada cupom e a alíquota de distribuição foi preparada uma suspensão de 1,4 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ de lipídeo.

Para o preparo das suspensões para a análise “in vitro” multiplicaram-se os valores de 47 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ de resíduo orgânico em superfície e 30 % de lipídeo no embutido fermentado cárneo, obtendo-se a concentração de 14,0 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ de lipídeo, além das concentrações de 21,0 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ e 7,0 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ de lipídeo, 50 % maior e 50 % menor, respectivamente.

3.3.1.3. Preparo de solução de sacarose

Foi preparada solução estoque de sacarose (Vetec), esterilizada por filtração em membrana com poros de 0,20 μm (Sartorius), utilizando sistema de filtração Millipore. A solução foi armazenada em ultra freezer a -80°C.

Para a avaliação da sacarose aderida aos cupons de aço inoxidável multiplicaram-se os valores de 47 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de resíduo orgânico em superfície e 2,5% de carboidrato no embutido fermentado cárneo, obtendo-se concentração de 1,2 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ de sacarose. Considerando-se a área de cada cupom e a alíquota de distribuição foi preparada uma solução de 0,12 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ de sacarose.

Para o preparo das soluções para a análise “in vitro” multiplicaram-se os valores de 47 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ de resíduo orgânico em superfície e 2,5 % de carboidrato no embutido fermentado cárneo, obtendo-se a concentração de 1,2

mg.mL⁻¹ de sacarose, além das concentrações de 1,8 mg.mL⁻¹ e 0,6 mg.mL⁻¹ de sacarose, 50 % maior e 50 % menor, respectivamente.

3.3.2. Preparo de suspensões de microrganismos

A concentração de cada microrganismo nas análises de suspensões “in vitro” e aderidas ao aço inoxidável foram determinadas a partir de testes preliminares com suspensões de microrganismos com concentrações conhecidas, onde foram feitas leituras no equipamento de bioluminescência.

A escolha recaiu sobre as concentrações em que foi possível obter leitura no luminômetro tanto para *Staphylococcus carnosus*, quanto para os esporos de *Bacillus subtilis*, permitindo uma comparação entre ambos, e ao mesmo tempo fosse compatível com o grau de contaminação em alimentos e superfícies que entram em contato com alimentos. A alíquota coletada na amostragem com o kit AQUA-TRACE TOTAL (0,1 mL) foi levada em consideração, correspondendo a uma diluição 1:10.

3.3.2.1. Preparo de suspensão de *Staphylococcus carnosus*

Cultura pura de *S. carnosus*, cedida pelo Departamento de Microbiologia/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, foi mantida congelada à temperatura de -80°C em tubo Eppendorf contendo Brain Heart Infusion (BHI – Biobrás) e glicerol (80:20).

A ativação da cultura de *S. carnosus* foi realizada por meio de três repicagens consecutivas em caldo BHI, com incubação em estufa à temperatura de 35°C por 24 horas. O inóculo foi diluído em tampão fosfato de Butterfield (ACUFF, 1992) previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos em autoclave.

A concentração da suspensão foi estimada por contagens em microscópio (Olympus BX 40), com lente objetiva de imersão de 100 vezes, segundo metodologia descrita por SPLITTISOESSER (1992) e os resultados expressos em contagem direta microscópica por mililitro (CDM.mL⁻¹).

Partindo-se de uma suspensão com 5,4x10⁹ CDM.mL⁻¹ prepararam-se mediante diluição em tampão fosfato suspensões com 5,4x10⁶ CDM.mL⁻¹ a

$5,4 \times 10^1$ CDM.mL⁻¹. Após realizados os testes preliminares com o luminômetro a concentração de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ foi escolhida para a análise “in vitro” e $5,4 \times 10^5$ CDM.mL⁻¹, $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹, $5,4 \times 10^3$ CDM.mL⁻¹ para a análise em aço inoxidável. Concentrações acima destes valores extrapolaram o limite de leitura do luminômetro.

3.3.2.2. Preparo de suspensão de esporos de *Bacillus subtilis*

Cultura pura de *B. subtilis*, cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, foi mantida em tubo de ensaio com tampa rosqueável em ultra freezer à temperatura de - 80°C em ágar nutriente (Isofar-Micro Med).

A ativação foi efetuada por meio de três repicagens consecutivas em ágar nutriente inclinado, solidificado e incubado por 24 horas a 30°C a cada etapa. A suspensão de células vegetativas foi obtida pela adição de tampão fosfato e agitação manual.

Posteriormente, volumes de 1 mL desta suspensão foram inoculados nas superfícies de 50 mL de meio de esporulação contidos em garrafas de Roux de 800 mL. O meio de esporulação foi preparado utilizando-se: 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de triptona, 1,0 g de amido, 10,0 mg de sulfato de manganês, 20,0 g de ágar em um volume final de 1000 mL de água destilada com o pH final entre 6,9 e 7,1.

A formação de esporos foi acompanhada mediante observação direta em microscópio de contraste de fase (Olympus BX 40), com lente objetiva de imersão de 100 vezes, de raio 0,11 mm e fator $1,3 \times 10^6$, até a obtenção de cerca de 90 a 95% de esporulação. Ao final desse período, foram adicionados 20 mL de água destilada sobre a superfície do meio de cultura contido cada garrafa de Roux. O sobrenadante foi coletado separadamente em tubos de centrifuga e centrifugados a 3000 g por 10 minutos, à temperatura de 4°C (centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA-14). Os sedimentos de esporos foram ressuspensos em água destilada estéril, sendo novamente centrifugados. O processo foi repetido por cinco vezes. Ao final, os esporos de cada tubo da centrífuga foram suspensos em 1 mL de solução glicerol e água (15:85) e congelados em ultra freezer a - 80°C.

A concentração da suspensão nos tubos Eppendorf foi estimada da mesma maneira que no item 3.3.2.1, previamente submetida a um choque térmico de 80°C por 15 minutos antes do plaqueamento.

Partindo-se de uma suspensão com $2,9 \times 10^9$ CDM.mL⁻¹ prepararam-se mediante diluição em tampão fosfato suspensões com $2,9 \times 10^6$ CDM.mL⁻¹ a $2,9 \times 10^1$ CDM.mL⁻¹. Após realizados os testes preliminares com o luminômetro a concentração de $2,9 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ foi escolhida para a análise “in vitro” e $2,9 \times 10^5$ CDM.mL⁻¹, $2,9 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹, $2,9 \times 10^3$ CDM.mL⁻¹ para a análise em aço inoxidável. Concentrações abaixo destes valores não permitiram leitura satisfatória do luminômetro, produzindo números muito baixos, o que poderia levar a erros na interpretação dos resultados.

3.4. Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos na determinação de ATP pela técnica de bioluminescência em análises “in vitro”

Foi avaliada a interferência de suspensões e soluções de substâncias orgânicas e microrganismos isoladamente ou em combinações no número de URL, conforme Quadro 1.

As suspensões e soluções testes foram preparadas de forma asséptica em tubos plásticos com tampa, com capacidade para 50 mL, utilizando as suspensões e soluções dos itens 3.3.1.1 a 3.3.1.3, 3.3.2.1 e 3.3.2.2 na temperatura de 30°C. Então, foi realizada a determinação do número de URL pela técnica de ATP bioluminescência.

Quadro 1 – Suspensões e soluções contendo substâncias orgânicas ou microrganismos de forma isolada ou combinadas entre si para avaliar a interferência no número de Unidades Relativas de Luz

Suspensão e Solução
Caseína
Lipídeo
Sacarose
Caseína+Sacarose
Caseína+Lipídeo
Lipídeo+Sacarose
Caseína+Sacarose+Lipídeo
<i>Staphylococcus carnosus</i>
Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>
Caseína+ <i>Staphylococcus carnosus</i>
Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i>
Sacarose+ <i>Staphylococcus carnosus</i>
Caseína + Sacarose+ <i>Staphylococcus carnosus</i>
Caseína + Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i>
Lipídeo + Sacarose+ <i>Staphylococcus carnosus</i>
Caseína+Sacarose+Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i>
Caseína+Sacarose+Lipídeo+Esporo de <i>Bacillus subtilis</i>

3.4.1. Determinação de ATP nas suspensões e soluções testes

As suspensões e soluções testes foram submetidas às análises pela técnica de ATP bioluminescência, em equipamento BiotraceXcel e metodologia segundo BIOTRACE (2000), sendo os resultados expressos em URL. Foi utilizado o kit AQUA-TRACE TOTAL para determinação do conteúdo de ATP total da amostra. A análise consistiu em coletar uma alíquota de aproximadamente 0,1 mL da suspensão e, ou, solução com o kit, introduzi-lo na cubeta que contém o complexo enzimático luciferina/luciferase, realizar uma agitação manual por 20 segundos para promover a reação de formação de luz. Após isso, o kit foi introduzido no luminômetro, onde foi realizada a leitura após aproximadamente 10 segundos.

3.5. Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável na determinação de ATP pela técnica de bioluminescência

Foi avaliada a interferência de suspensões de substâncias orgânicas e microrganismos isoladamente ou em combinações, aderidas a cupons de aço inoxidável, no número de URL, conforme Quadro 2.

As suspensões e soluções testes foram preparadas de forma asséptica em tubos plásticos com tampa, com capacidade para 50 mL, utilizando as suspensões e soluções dos itens 3.3.1.1 a 3.3.1.3, 3.3.2.1 e 3.3.2.2 na temperatura de 30°C. Então, foi realizada a determinação do número de URL pela técnica de ATP bioluminescência.

Então, de forma asséptica, utilizando uma pipeta automática com ponteiros descartáveis estéreis, uma alíquota de 1 mL de cada suspensão ou solução foi distribuída na forma de gotas na superfície dos cupons de aço inoxidável, com 8 gotas na horizontal e 9 na vertical, totalizando 72 gotas. Em seguida, os cupons foram mantidos em repouso por 30 minutos em capela sob fluxo laminar, com a temperatura mantida a 35°C. Após este período foi, realizada a determinação do número de URL pela técnica de ATP bioluminescência.

Quadro 2 – Suspensões e soluções contendo substâncias orgânicas ou microrganismo de forma isolada ou combinadas entre si, aderidas aos cupons de aço inoxidável AISI 304, nº4, para avaliar a interferência na determinação do número de Unidades Relativas de Luz

Suspensão e Solução	CDM.cm ⁻²
Caseína	
Lipídeo	
Sacarose	
Caseína+Sacarose	
Caseína+Lipídeo	
Lipídeo+Sacarose	
Caseína+Sacarose+Lipídeo	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	$\left\{ \begin{array}{l} 5,4 \times 10^3 \\ 5,4 \times 10^2 \\ 5,4 \times 10^1 \end{array} \right.$
Esporo de <i>Bacillus subtilis</i>	$\left\{ \begin{array}{l} 2,9 \times 10^3 \\ 2,9 \times 10^2 \\ 2,9 \times 10^1 \end{array} \right.$
Caseína+Sacarose+Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	$\left\{ \begin{array}{l} 5,4 \times 10^3 \\ 5,4 \times 10^2 \\ 5,4 \times 10^1 \end{array} \right.$
Caseína+Sacarose+Lipídeo+Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	$\left\{ \begin{array}{l} 2,9 \times 10^3 \\ 2,9 \times 10^2 \\ 2,9 \times 10^1 \end{array} \right.$

3.5.1. Determinação de ATP nos cupons de aço inoxidável

A avaliação da superfície dos cupons de aço inoxidável foi realizada pela técnica de ATP bioluminescência, em equipamento BiotraceXcel e metodologia BIOTRACE (2000), sendo os resultados expressos em URL. Foi utilizado o kit CLEAN-TRACE da Biotrace para determinação do conteúdo de ATP total. Cada kit possui um swab de algodão que foi friccionado na superfície dos cupons, previamente aderidos das suspensões e soluções testes, formando um ângulo de 30 graus, por duas vezes na direção de cada diagonal com movimento de vai-e-vem. O swab foi introduzido na cubeta que contém o

complexo enzimático luciferina/luciferase, seguida de uma agitação manual por 20 segundos, sendo promovida a reação de formação de luz. Após isso, o kit foi introduzido no luminômetro, onde foi realizada a leitura após aproximadamente 10 segundos.

Segundo as recomendações da Biotrace (2000), as superfícies de equipamentos e utensílios podem ser consideradas em condições higiênicas satisfatórias quando apresentarem resultados menores ou iguais a 150 URL. Quando a leitura de URL estiver no intervalo de 151 a 300, serão consideradas em condição de alerta. Para resultados acima de 300 URL as superfícies serão consideradas em condições higiênicas insatisfatórias.

3.6. Delineamento experimental e análise dos resultados

Na análise estatística dos resultados foram empregados diferentes procedimentos do programa Statistical Analysis System – SAS/2004 – licenciado para a Universidade Federal de Viçosa:

a1) O ensaio para avaliação dos três tipos e três concentrações de substâncias orgânicas em suspensão seguiu um modelo de delineamento aninhado com concentração por substância. O experimento foi realizado em três repetições e as determinações do número de URL foram feitas em duplicatas.

a1.1) As médias das leituras provenientes dos tratamentos com uma substância orgânica isolada nas concentrações iguais às determinadas no item 3.1.1 foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

a2) O ensaio para avaliação dos três tipos e três concentrações de substâncias orgânicas em suspensão adicionada de *S. carnosus* seguiu, também, um modelo de delineamento aninhado com concentração por substância. O experimento foi realizado em três repetições e as determinações do número de URL foram feitas em duplicatas.

- a2.1) As médias das leituras provenientes de todos os tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.
- b1) A avaliação das combinações de substâncias orgânicas em suspensão seguiu modelo de delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos em três repetições. As determinações do número de URL foram feitas em duplicatas. Os contrastes de interesse, testados pelo teste F, estão representados a seguir:
- Contraste 1: Caseína vs. Caseína+Sacarose
 - Contraste 2: Caseína vs. Caseína+Lipídeo
 - Contraste 3: Lipídeo vs. Caseína+Lipídeo
 - Contraste 4: Lipídeo vs. Lipídeo+Sacarose
 - Contraste 5: Sacarose vs. Caseína+Sacarose
 - Contraste 6: Sacarose vs. Lipídeo+Sacarose
 - Contraste 7: Caseína+Sacarose vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo
 - Contraste 8: Caseína+Lipídeo vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo
 - Contraste 9: Lipídeo+Sacarose vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo
- b2) A avaliação da combinação de duas ou três substâncias orgânicas em suspensão adicionada de *S. carnosus* ou esporos de *B. subtilis* seguiu modelo de delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos em três repetições. As determinações do número de URL foram feitas em duplicatas.
- b3) A avaliação da combinação de três substâncias orgânicas em suspensão adicionada de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ *S. carnosus* ou $2,9 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ esporos de *B. subtilis* seguiu modelo de delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos em três repetições. As determinações do número de URL foram feitas em duplicatas. Os contrastes de interesse, testados pelo teste F, estão representados a seguir:
- Contraste 10: Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + *S. carnosus*

- Contraste 11: *S. carnosus* vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + *S. carnosus*
- Contraste 12: Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de *B. subtilis*
- Contraste 13: Esporos de *B. subtilis* vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de *B. subtilis*

b4) A avaliação das combinações de substâncias orgânicas aderidas ao aço inoxidável seguiu modelo de delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos em três repetições. Os contrastes de interesse, testados pelo teste F, estão representados a seguir:

- Contraste 14: Caseína vs. Caseína+Sacarose
- Contraste 15: Caseína vs. Caseína+Lipídeo
- Contraste 16: Lipídeo vs. Caseína+Lipídeo
- Contraste 17: Lipídeo vs. Lipídeo+Sacarose
- Contraste 18: Sacarose vs. Caseína+Sacarose
- Contraste 19: Sacarose vs. Lipídeo+Sacarose
- Contraste 20: Caseína+Sacarose vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo
- Contraste 21: Caseína+Lipídeo vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo
- Contraste 22: Lipídeo+Sacarose vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo

b5) A avaliação da combinação de três substâncias orgânicas aderidas ao aço inoxidável adicionada de *S. carnosus* ou esporos de *B. subtilis* seguiu modelo de delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos em três repetições. As determinações do número de URL foram feitas em duplicatas. Os contrastes de interesse, testados pelo teste F, estão representados a seguir:

- Contraste 23: Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + *S. carnosus* ($5,4 \times 10^3$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 24: *S. carnosus* ($5,4 \times 10^3$ CDM.mL⁻¹) vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + *S. carnosus* ($5,4 \times 10^3$ CDM.cm⁻²)

- Contraste 25: Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + *S. carnosus* ($5,4 \times 10^2$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 26: *S. carnosus* ($5,4 \times 10^2$ CDM.cm⁻²) vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + *S. carnosus* ($5,4 \times 10^2$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 27: Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + *S. carnosus* ($5,4 \times 10^1$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 28: *S. carnosus* ($5,4 \times 10^1$ CDM.cm⁻²) vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + *S. carnosus* ($5,4 \times 10^1$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 29: Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^3$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 30: Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^3$ CDM.cm⁻²) vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^3$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 31: Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^2$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 32: Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^2$ CDM.cm⁻²) vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^2$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 33: Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^1$ CDM.cm⁻²)
- Contraste 34: Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^1$ CDM.cm⁻²) vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de *B. subtilis* ($2,9 \times 10^1$ CDM.cm⁻²)

c1) O experimento para avaliar a diferença entre *S. carnosus* e esporos de *B. subtilis*, quanto ao número de URL, foi realizado com três repetições e a determinação do número de URL's em duplicatas. As duas médias foram comparadas pelo teste "t" de Student.

c2) O experimento para avaliar a diferença entre suspensões contendo as três substâncias orgânicas adicionadas de *S. carnosus* ou esporos de *B. subtilis* foi realizado com três repetições e a determinação do número de URL em duplicatas. As duas médias foram comparadas pelo teste "t" de Student.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos em suspensão na determinação do número de URL

Pode-se observar, no Quadro 3, o logaritmo decimal do número URL das suspensões e soluções de substâncias orgânicas e microrganismos.

4.1.1. Interferência de substâncias orgânicas

Constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$), no número de URL, entre caseína, lipídeo e sacarose, demonstrando que há diferença entre os tipos de substâncias orgânicas empregadas nas suspensões e soluções. A sacarose apresentou o menor número de URL quando comparada à caseína e lipídeo, sendo que as duas últimas não apresentaram diferença significativa entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan (Quadro 4), nas condições estudadas.

Os números de URL baixos determinados neste estudo eram esperados, uma vez que proteína, lipídeo e sacarose em suas formas puras, não contêm moléculas de ATP. É importante salientar que os testes realizados com os kits sem a presença de amostra detectaram valores do logaritmo do número de URL variando entre 1,15 e 1,30, portanto, bem próximo dos valores obtidos com as substâncias analisadas.

O fato de as concentrações diferentes empregadas para cada uma das substâncias não apresentarem diferença significativa ($p \geq 0,05$) confirma a pequena contribuição destas no número de URL (Quadro 4). Talvez, contaminações com alguma fonte de ATP de origem desconhecida, não passíveis de serem controladas, tenham ocorrido durante o experimento.

Quadro 3 – Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas ou microrganismos de forma isolada ou combinadas entre si ^a

Suspensão e Solução	mg.mL ⁻¹	Média ($\pm \sigma$)
Caseína	10,5	1,84 (0,04)
	7,0	1,86 (0,05)
	3,5	1,74 (0,07)
Lipídeo	21,0	2,01 (0,15)
	14,0	1,81 (0,23)
	7,0	1,83 (0,30)
Sacarose	1,8	1,68 (0,12)
	1,2	1,65 (0,14)
	0,6	1,69 (0,13)
Caseína+Sacarose	7,0 + 1,2	2,02 (0,02)
Caseína+Lipídeo	7,0 + 14,0	2,06 (0,08)
Lipídeo+Sacarose	14,0 + 1,2	1,56 (0,13)
Caseína+Sacarose+Lipídeo	7,0 + 1,2 + 14,0	2,03 (0,06)
<i>Staphylococcus carnosus</i>		3,79 (0,14)
Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>		1,95 (0,07)
Caseína+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	10,5	3,12 (0,21)
	7,0	3,13 (0,12)
	3,5	3,76 (0,23)
Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	21,0	3,96 (0,02)
	14,0	3,88 (0,09)
	7,0	4,04 (0,03)
Sacarose+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	1,8	3,83 (0,10)
	1,2	3,93 (0,10)
	0,6	3,94 (0,06)
Caseína+Sacarose+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	7,0 + 1,2	3,49 (0,22)
Caseína+Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	7,0 + 14,0	3,38 (0,27)
Lipídeo+Sacarose+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	14,0 + 1,2	3,63 (0,09)
Caseína+Sacarose+Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	7,0 + 1,2 + 14,0	3,23 (0,08)
Caseína+Sacarose+Lipídeo+Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	7,0 + 1,2 + 14,0	2,09 (0,05)

^a Suspensões com *Staphylococcus carnosus* e com esporos de *Bacillus subtilis* contendo $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ e $2,9 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ respectivamente.

Quadro 4 - Média e desvio padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de caseína, lipídeo e sacarose

Suspensão e Solução	Média ($\pm\sigma$)
Caseína	1,81 ^a (0,08)
Lipídeo	1,88 ^a (0,24)
Sacarose	1,67 ^b (0,12)
Médias com a mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.	

Pôde-se observar, no Quadro 5, um aumento significativo ($p<0,01$) no número de URL nas suspensões que continham caseína e lipídeo, bem como para a combinação caseína e sacarose, quando comparadas com as suspensões contendo apenas caseína ou lipídeo. Já as médias do número de URL entre sacarose e a combinação caseína e sacarose não foram diferentes entre si. Por outro lado, verificou-se uma diminuição desses números na suspensão lipídeo e sacarose quando contrastada com a respectiva suspensão e solução contendo apenas uma destas substâncias. Também, houve uma diminuição significativa ($p<0,01$) no número de URL na suspensão com as três substâncias em relação àquela contendo caseína e lipídeo. Finalmente, observou-se um aumento desses números para a combinação das três substâncias em relação à caseína e sacarose ou lipídeo e sacarose.

Estes resultados novamente confirmam que as substâncias orgânicas têm pouca interferência no número de URL. Os valores detectados para as suspensões e soluções com uma substância foram baixos, assim como aqueles obtidos para as combinações. Não se constatou, em nenhum tratamento, efeito aditivo no número de URL determinado para cada substância isoladamente.

De acordo com as recomendações do fabricante do equipamento de bioluminescência usado nesse experimento, caso as amostras analisadas fossem oriundas de superfícies de processamento de alimentos indicariam que elas estariam em condições higiênicas satisfatórias, com valores do logaritmo do número de URL abaixo de 2,18.

Quadro 5– Média e desvio padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz das suspensões e soluções de substâncias orgânicas ^a

Suspensão e Solução	Média ($\pm\sigma$)
Caseína	1,87 (0,02)
Lipídeo	1,81 (0,09)
Sacarose	1,65 (0,05)
Caseína+Lipídeo	2,07 (0,03)
Caseína+Sacarose	2,02 (0,02)
Lipídeo+sacarose	1,57 (0,08)
Caseína+Lipídeo+Sacarose	2,03 (0,05)

^a Caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0; 14,0 e 1,2 mg.mL⁻¹, respectivamente.

4.1.2 . Interferência de microrganismos

Em relação aos microrganismos avaliados isoladamente, o número médio de URL para suspensões de *S. carnosus* foi maior ($p<0,01$) do que aquele obtido nas suspensões com esporos de *B. subtilis*, conforme o teste 't' de Student. O logaritmo do número de URL foi 3,79 para as células vegetativas e 1,95 para os esporos bacterianos (Quadro 3). Esta diferença, apesar de as suspensões estarem em concentrações microbianas próximas, pode ser explicada, levando-se em consideração a diferença no conteúdo intracelular de ATP entre células vegetativas e esporos bacterianos. Os esporos bacterianos por estarem em um estado criptobiótico não apresentam metabolismo, acarretando em baixos níveis de ATP e ausência de transporte de elétrons (AKUTSU, 2001 e BAKER et al. 1992). Estes fatores levam a uma reduzida leitura na medida de URL. Em seu trabalho, KODAKA et al. (1996) determinaram uma concentração 10^{-17} mol de ATP por célula vegetativa e de 10^{-21} mol de ATP por esporo. Isto significa que a concentração de ATP do esporo bacteriano é 10000 vezes menor.

Este fato também explica a diferença ($p<0,01$) no número médio de URL entre suspensões contendo simultaneamente caseína, lipídeo e sacarose adicionadas de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ de *S. carnosus*, cujo logaritmo do número de URL atingiu o valor de 3,23, e quando adicionadas de $2,9 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ de esporos de *B. subtilis*, o logaritmo do número de URL foi de 2,09, conforme o teste "t" de Student.

Desta forma, os valores do logaritmo do número de URL acima de 2,48 (300 URL) obtidas para a suspensão de *S. carnosus* indicariam condições higiênicas insatisfatórias, se as amostras analisadas fossem oriundas de superfícies de processamento (Quadro 3). Já os valores para as suspensões de esporos de *B. subtilis* atingiram valores abaixo de 2,18 (150 URL), que significa seguindo o mesmo raciocínio, que se as amostras fossem de uma superfície para processamento, estariam em condições higiênicas satisfatórias. Assim, uma superfície com contagem elevada de esporos seria aprovada para o processamento de alimentos.

4.1.3. Interferência de combinações entre substâncias orgânicas e microrganismos

Constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$), no número de URL, entre caseína, lipídeo ou sacarose adicionada de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ de *S. carnosus*, demonstrando a influência do tipo de substância presente na suspensão.

Observou-se, ainda, diferença no número de URL entre as três concentrações de uma mesma substância adicionada de *S. carnosus*, diferentemente do ocorrido na análise com suspensões e soluções contendo uma substância orgânica sem adição do microrganismo.

Por exemplo, o número de URL foi maior ($p < 0,05$) na suspensão contendo 3,5 mg.mL⁻¹ de caseína ou nas suspensões contendo 21,0 e 7,0 mg.mL⁻¹ de lipídeo, ambas adicionadas de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ de *S. carnosus* (Quadros 6). Por outro lado, aquelas que continham sacarose e o microrganismo não apresentaram diferenças significativas entre si ($p \geq 0,05$), no número de URL.

Observando-se os valores do logaritmo do número de URL dos testes com uma substância orgânica combinada ou não aos microrganismos, constata-se que a célula vegetativa é a principal fonte de moléculas de ATP na suspensão e que possíveis interações entre a bactéria e as substâncias afetaram a leitura. RICHARDSON et al. (1980) estudaram a distribuição destes nucleotídeos no leite bovino e constataram a possibilidade de associação de moléculas de ATP com a caseína, impedindo-o de reagir com o complexo

luciferina/luciferase. Essa informação permite inferir que: quanto menor a quantidade de substâncias orgânicas na suspensão, maior é o número de URL. Neste experimento, essa inferência foi confirmada para as suspensões de caseína e lipídeo que apresentou número de URL maior nas suspensões com menores concentrações (Quadro 6). Aquela inferência não se confirmou para as suspensões de sacarose e o microrganismo, que não apresentaram alterações no número de URL nas diferentes concentrações da substância.

Não se verificou diferença significativa ($p \geq 0,5$) nas combinações contendo as menores concentrações de caseína, lipídeo ou sacarose adicionadas de *S. carnosus*. Nas outras concentrações dessas substâncias, o número de URL das suspensões de lipídeo ou sacarose, adicionada do microrganismo, foram maiores do que os da suspensão de caseína.

Em relação às suspensões contendo duas ou três substâncias orgânicas adicionadas de *S. carnosus* não foi constatada diferença significativa, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F, no número de URL. Este resultado difere daquele apresentado nas comparações entre suspensões com duas ou três substâncias sem adição de microrganismos, quando foi constatada diferença entre as suspensões (Quadro 5).

Quadro 6 – Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões de caseína, lipídeo ou sacarose adicionadas de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ de *Staphylococcus carnosus*

Concentração	Média ($\pm\sigma$)		
	Caseína ¹ <i>S. carnosus</i>	Lipídeo ² <i>S. carnosus</i>	Sacarose ³ <i>S. carnosus</i>
[>]	3,12 ^{bB} (0,21)	3,96 ^{abA} (0,02)	3,83 ^{aA} (0,10)
[=]	3,13 ^{bB} (0,12)	3,88 ^{bA} (0,09)	3,93 ^{aA} (0,10)
[<]	3,76 ^{aA} (0,23)	4,04 ^{aA} (0,03)	3,94 ^{aA} (0,06)

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, em uma mesma coluna, e seguidas de uma mesma letra maiúscula, em uma mesma linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

¹ Caseína: concentrações [>], [=] e [<] iguais a 10,5; 7,0 ou 3,5 mg.mL⁻¹, respectivamente.

² Lipídeo: concentrações [>], [=] e [<] iguais a 21,0; 14,0 ou 7,0 mg.mL⁻¹, respectivamente.

³ Sacarose: concentrações [>], [=] e [<] iguais a 1,8; 1,2 ou 0,6 mg.mL⁻¹, respectivamente.

O número de URL na suspensão contendo apenas célula vegetativa foi sempre maior do que qualquer suspensão contendo apenas substâncias orgânicas, isoladas ou em combinações, em alguns casos, os valores do logaritmo do número de URL foram duas vezes maiores (Quadro 3). A presença do microrganismo na combinação com as substâncias orgânicas acrescentou uma quantidade grande de ATP à suspensão, nivelando a concentração do nucleotídeo para uma faixa de valores elevados, proporcionando a detecção do número de URL similares. Isto mostra, mais uma vez, a pouca interferência das substâncias orgânicas na bioluminescência das suspensões avaliadas. A presença destas em suspensões contendo uma fonte grande de ATP não foi suficiente para que fosse detectada qualquer diferença no número de URL.

Com relação à suspensão contendo três substâncias orgânicas adicionadas de *S. carnosus* foram constatados dois resultados diferentes. No primeiro deles, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de URL quando a comparação foi somente com o microrganismo (Quadro 7). Uma possível explicação para este fato pode ser o relato que WEBSTER et al. (1988) fazem sobre a sensibilidade da técnica de bioluminescência na determinação de ATP microbiano em amostras de leite cru, detectando a interferência do leite na leitura, em um luminômetro, da luz produzida em um experimento com ATP, devido à absorção e dispersão desta pelo material coloidal da amostra. Isto poderia acontecer em um sistema semelhante ao leite, por exemplo, como o usado no presente estudo, em que as suspensões eram compostas de gordura, proteína, carboidrato e microrganismos. Além disso, BAKER et al. (1992) citam que a leitura da luz emitida após a reação de bioluminescência pode ser afetada pela turbidez e cor da amostra. No segundo resultado, observou-se um aumento de quase 60% no número de URL ($p < 0,05$) na comparação com a suspensão contendo as três substâncias, demonstrando mais uma vez a pequena contribuição em ATP da caseína, lipídeo e sacarose, mesmo juntas na suspensão, evidenciando as células vegetativas como a grande fonte do nucleotídeo na combinação.

De acordo com as proposições do fabricante do equipamento de bioluminescência usado nesse experimento, caso as amostras de *S. carnosus* adicionadas de caseína, lipídeo ou sacarose, isoladamente ou em

combinações fossem oriundas de superfícies de processamento de alimentos indicariam que as mesmas estariam em condições higiênicas insatisfatórias, com valores do logaritmo de URL acima de 2,48.

Para as suspensões de esporos de *B. subtilis* adicionadas de substâncias orgânicas, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) no número de URL quando comparadas às suspensões de caseína, lipídeo e sacarose (Quadro 7). Essas suspensões adicionadas de esporos de *B. subtilis*, assim como àquela que continha apenas o microrganismo, indicariam condições higiênicas satisfatórias, caso as amostras analisadas fossem coletadas em superfícies para processamento de alimentos. Essa conclusão deve-se ao fato de que o logaritmo do número de URL máximo sugerido pelo fabricante do equipamento de bioluminescência usado no experimento é de 2,18 (150 URL).

Quadro 7 – Média e desvio padrão dos logaritmos decimais do número de Unidades Relativas de Luz das suspensões e soluções de substâncias orgânicas adicionadas de microrganismos^{ab}

Suspensão e Solução	Média ($\pm\sigma$)
Caseína+Lipídeo+Sacarose	2,03 (0,05)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	3,79 (0,12)
Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	1,95 (0,05)
Caseína+Lipídeo+Sacarose+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	3,23 (0,08)
Caseína+Lipídeo+Sacarose+Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	2,09 (0,05)

^a Caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0; 14,0 e 1,2 mg.mL⁻¹, respectivamente.

^b *Staphylococcus carnosus* e esporos de *Bacillus subtilis* nas concentrações de $5,4 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹ e $2,9 \times 10^4$ CDM.mL⁻¹, respectivamente.

4.2. Interferência de substâncias orgânicas e microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável na determinação do número de URL

Pode-se observar, no Quadro 8, o logaritmo decimal do número de URL de suspensões contendo substâncias orgânicas e microrganismos, de forma isolada ou em combinações, aderidas aos cupons de aço inoxidável.

Quadro 8 – Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções contendo substâncias orgânicas ou microrganismo de forma isoladas ou combinadas entre si, aderidas aos cupons de aço inoxidável AISI 304, n°4 ^a

Suspensão e Solução	CDM.cm ⁻²	Média (±σ)
Caseína		2,06 (0,12)
Lipídeo		1,82 (0,12)
Sacarose		1,77 (0,05)
Caseína+Sacarose		2,08 (0,05)
Caseína+Lipídeo		1,90 (0,17)
Lipídeo+Sacarose		1,95 (0,11)
Caseína+Sacarose+Lipídeo		2,07 (0,09)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	5,4 x 10 ³	3,77 (0,07)
	5,4 x 10 ²	2,60 (0,07)
	5,4 x 10 ¹	2,21 (0,11)
Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	2,9 x 10 ³	2,35 (0,02)
	2,9 x 10 ²	2,07 (0,05)
	2,9 x 10 ¹	1,92 (0,05)
Caseína+Sacarose+Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i>	5,4 x 10 ³	3,53 (0,04)
	5,4 x 10 ²	2,77 (0,06)
	5,4 x 10 ¹	2,29 (0,01)
Caseína+Sacarose+Lipídeo+Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	2,9 x 10 ³	2,14 (0,05)
	2,9 x 10 ²	2,04 (0,03)
	2,9 x 10 ¹	1,94 (0,04)

^a caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0; 14,0 e 1,2 µg.cm⁻², respectivamente.

4.2.1. Interferência de substâncias orgânicas

Em relação às suspensões e soluções contendo uma, duas ou três substâncias orgânicas aderidas aos cupons de aço inoxidável, os resultados mostram que as combinações entre as substâncias quando aderidas ao aço inoxidável apresentaram comportamento diferenciado no número de URL (Quadro 9), de forma semelhante ao observado nas análises em suspensão (Quadros 6 e 7). Assim, observou-se um aumento neste número na suspensão proteína e sacarose em contraste com a caseína.

Constatou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de URL nas suspensões contendo caseína e lipídeo comparadas aquelas contendo somente caseína. Quando a comparação foi entre sacarose e a combinação caseína e sacarose, não se verificou diferença significativa ($p \geq 0,05$) no número de URL. O mesmo resultado foi constatado para suspensão de caseína e lipídeo comparada com lipídeo ou lipídeo e sacarose comparada com suspensões contendo apenas uma destas substâncias.

Por outro lado, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de URL na suspensão com as três substâncias em relação àquela contendo caseína e sacarose. Finalmente, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de URL na comparação das três substâncias em relação à combinação de caseína e lipídeo e também lipídeo e sacarose.

De acordo com as proposições do fabricante do equipamento de bioluminescência usado nesse experimento, caso as amostras analisadas fossem oriundas de superfícies de processamento de alimentos indicariam que elas estariam em condições higiênicas satisfatórias, com valores do LURL abaixo de 2,18, resultado semelhante ao verificado para as análises com suspensões.

Quadro 9 – Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas aderidas ao aço inoxidável^a

Suspensão e Solução	Média ($\pm\sigma$)
Caseína	2,06 (0,12)
Lipídeo	1,82 (0,12)
Sacarose	1,77 (0,05)
Caseína+Lipídeo	1,90 (0,17)
Caseína+Sacarose	2,08 (0,05)
Lipídeo+Sacarose	1,95 (0,11)
Caseína+Lipídeo+Sacarose	2,07 (0,09)

^a Caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0; 14,0 e 1,2 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$, respectivamente.

4.2.2. Interferência de combinações entre substâncias orgânicas e microrganismos

Na Figura 2 e no Quadro 10, observa-se o aumento no número de URL ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de microrganismos, para as suspensões de *S. carnosus* ou esporos de *B. subtilis*, adicionadas ou não de substâncias orgânicas, aderidas ao aço inoxidável. Os números de URL foram maiores para as suspensões contendo células vegetativas do que para as que continham esporos bacterianos, assim como já havia sido verificado para as análises “in vitro” (Quadro 3). Como já havia sido mencionado, a diferença no conteúdo intracelular de ATP entre células vegetativas e esporos bacterianos pode ser a explicação para os menores números de URL determinados para os esporos.

Quadro 10 – Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões de microrganismos, adicionadas ou não de três substâncias orgânicas, aderidas ao aço inoxidável ^a

	CDM.cm ⁻²	Média ($\pm\sigma$)	
		Sem substâncias orgânicas	Adição de três substâncias orgânicas
<i>Staphylococcus carnosus</i>	5,4x10 ³	3,77 (0,07)	3,53 (0,04)
	5,4x10 ²	2,60 (0,07)	2,77 (0,06)
	5,4x10 ¹	2,21 (0,11)	2,29 (0,01)
Esporo de <i>Bacillus subtilis</i>	2,9x10 ³	2,35 (0,02)	2,14 (0,05)
	2,9x10 ²	2,07 (0,05)	2,04 (0,03)
	2,9x10 ¹	1,92 (0,05)	1,94 (0,04)

^a Três substâncias orgânicas: caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações 7,0, 14,0 e 1,2 mg.mL⁻¹, respectivamente.

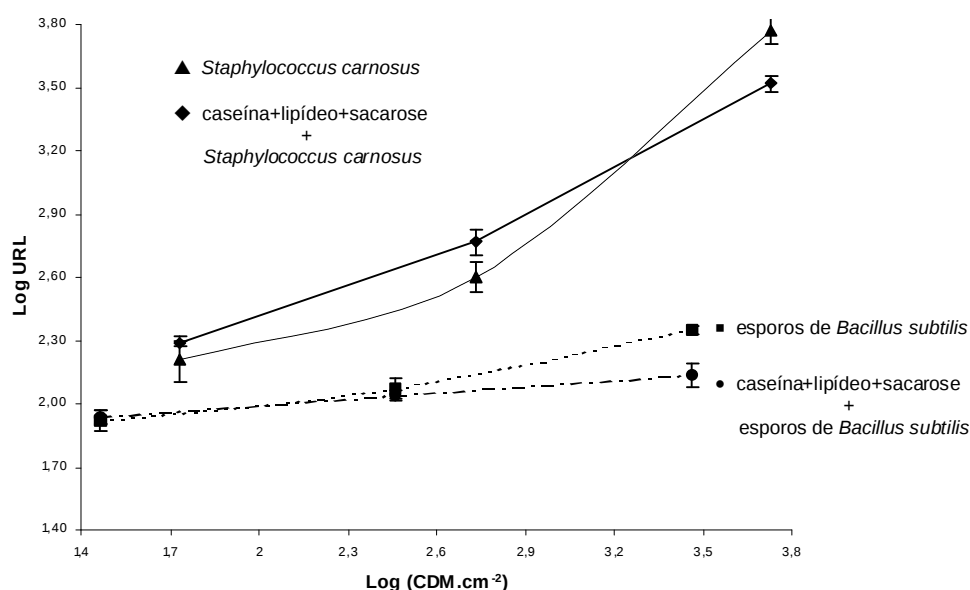


Figura 2 – Logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões de *Staphylococcus carnosus* (5,4x10³ CDM.cm⁻², 5,4x10² CDM.cm⁻² e 5,4x10¹ CDM.cm⁻²) ou esporos de *Bacillus subtilis* (2,9x10³ CDM.cm⁻², 2,9x10² CDM.cm⁻² e 2,9x10¹ CDM.cm⁻²), adicionadas ou não de caseína (7,0 mg.mL⁻¹), lipídeo (14,0 mg.mL⁻¹) e sacarose (1,2 mg.mL⁻¹), aderidas ao aço inoxidável AISI 304, n° 4.

Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de URL em todas as suspensões aderidas ao aço inoxidável, as três substâncias orgânicas adicionadas de *S. carnosus*, em relação àquelas contendo somente as substâncias orgânicas (Quadros 11), mostrando a grande diferença no nível de ATP entre as duas suspensões, ratificando a pequena interferência de caseína, lipídeo e sacarose na bioluminescência.

Verificou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de URL na comparação entre $5,4 \times 10^3$ CDM.cm⁻² de *S. carnosus* adicionada de três substâncias orgânicas e a suspensão contendo somente o microrganismo, ambas aderidas ao aço inoxidável. A explicação pode ser a interação entre o ATP e as micelas de caseína, ou seja, nem todo ATP microbiano estava disponível para reagir com a luciferina/luciferase. Neste caso, segundo as recomendações do fabricante do equipamento de bioluminescência usado nesse experimento, caso as amostras analisadas fossem oriundas de superfícies de processamento de alimentos indicariam que elas estariam em condições higiênicas insatisfatórias, com valores do logaritmo do número de URL acima de 2,48.

Detectou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de URL na comparação entre $5,4 \times 10^2$ CDM.cm⁻² de *S. carnosus* adicionada de três substâncias orgânicas e a suspensão contendo somente o microrganismo, ambas aderidas ao aço inoxidável. Constatou-se que neste caso não ocorreu o mesmo comportamento da concentração de $5,4 \times 10^3$ CDM.cm⁻², como era esperado. Caso essas amostras fossem provenientes de superfícies de processamento de alimentos seriam consideradas em condições higiênicas insatisfatórias, com valores do logaritmo do número de URL acima de 2,48, segundo recomendações do fabricante do luminômetro.

Não foi constatada diferença significativa ($p \geq 0,05$) no número de URL na comparação entre $5,4 \times 10^1$ CDM.cm⁻² de *S. carnosus* adicionada de três substâncias orgânicas e a suspensão contendo somente o microrganismo, ambas aderidas ao aço inoxidável. Neste caso, o número de microrganismo poderia estar abaixo do limite de detecção da técnica, e a presença das substâncias não foi suficiente para aumentar o nível de ATP em relação à suspensão contendo somente microrganismo. Superfícies de processamento de alimentos, contendo a mesma concentração de microrganismo e

substâncias orgânicas, seriam consideradas em condições higiênicas de alerta, com o logaritmo do número de URL entre 2,48 e 2,18, segundo recomendações do fabricante do luminômetro.

Para as suspensões contendo três substâncias orgânicas adicionadas de $2,9 \times 10^3$ CDM.cm⁻² de esporos de *B. subtilis*, aderidas ao aço inoxidável, constatou-se um aumento no número de URL em relação à suspensão com caseína, lipídeo e sacarose (Quadro 11). Nos contrastes envolvendo as outras duas concentrações de esporo bacteriano e a suspensão com as três substâncias orgânicas, aderidas ao aço inoxidável, percebeu-se uma redução no número de URL. Em todos os casos, se as amostras fossem oriundas de superfícies de alimentos, estas seriam consideradas em condições higiênicas satisfatórias, com o logaritmo do número de URL abaixo de 2,18, segundo recomendações do fabricante do luminômetro. Este resultado seria um falso negativo, liberando para o processamento de alimentos superfícies contaminadas com esporos bacterianos.

Quadro 11 – Média e desvio padrão do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas adicionadas ou não de microrganismos, aderidas ao inoxidável ^a

Suspensão e Solução (CDM.cm ⁻²)	Média ($\pm\sigma$)
Caseína+Lipídeo+Sacarose	2,07 (0,09)
<i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^3$)	3,77 (0,07)
<i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^2$)	2,60 (0,07)
<i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^1$)	2,21 (0,11)
Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^3$)	2,35 (0,02)
Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^2$)	2,07 (0,05)
Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^1$)	1,92 (0,05)
Caseína+Sacarose+Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^3$)	3,53 (0,04)
Caseína+Sacarose+Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^2$)	2,77 (0,06)
Caseína+Sacarose+Lipídeo+ <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^1$)	2,29 (0,01)
Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^3$)	2,14 (0,05)
Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^2$)	2,04 (0,03)
Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^1$)	1,94 (0,04)

^a Caseína, lipídeo e sacarose: concentrações de 7,0, 14,0 e 1,2 µg.cm⁻², respectivamente.

5. CONCLUSÕES

O número de URL foi afetado pela presença, mas não pela concentração de substâncias orgânicas em suspensão ou aderidas ao aço inoxidável. O número de URL foi maior para as células vegetativas do que para os esporos bacterianos nas análises “in vitro” e aderidas, e foi afetado pelo tipo e pela concentração da substância orgânica quando combinada com *S. carnosus* ou esporos de *B. subtilis*.

As substâncias orgânicas, os microrganismos e as combinações entre eles, tanto nas análises “in vitro” quanto aderidas ao aço inoxidável interferiram em maior ou menor grau na técnica de bioluminescência. Constata-se a possibilidade de obtenção de resultado falso negativo, principalmente na presença de esporos bacterianos aderidos, colocando em risco a qualidade microbiológica de produtos alimentícios processados em uma superfície nestas condições.

A determinação de ATP nas superfícies não deve ser a única técnica usada para monitorar a eficiência da higienização em indústrias de alimentos. Ela pode ser utilizada como uma ferramenta complementar da avaliação microbiológica tradicional. Além disso, para a obtenção de informações confiáveis, deve-se atender as limitações dessa técnica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUFF, G.R. Media, reagents and stains. In: VANDERZANT, C., SPLITTSOESSER, D.F. (ed.) **Compendium of Methods to the Microbiological Examination of Food**. 3^a ed. Washington: APHA, cap. 62, p.1093-1208, 1992.

ADAMS, M.R., HOPE, C.F.A. **Rapid methods in food microbiology**. Holanda: Elsevier, v.26, 330 p., 1989.

AKUTSU, C.K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. Viçosa, MG: UFV, 2001, 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

ANDRADE, N.J., MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 182 p., 1996.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2^aed., Viçosa: Editora UFV, 416 p., 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 17^a ed., Gaithersburg, 2000.

BAKER, J.M., GRIFFITHS, M.W., COLLINS-THOMPSON, D.L. Bacterial bioluminescence: applications in food microbiology. **Journal of Food Protection**, v.55, n.1, p.62-70, 1992.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise**. 15^a ed. São Paulo: Nobel, p.20, 1995.

BELL, C. BOWLES, C.D., TOSZEGHY, M.J.K., NEAVES, P. Development of a hygiene standard for raw milk based on the Lumac ATP-bioluminescence method. **International Dairy Journal**, v.6, p.709-713, 1996.

BIOTRACE. **BIOTRACE Xcel**. [S. I.]. Manual técnico, 140p., 2000.

BOBBIO, F.L. e BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 2° ed. São Paulo: Livraria Varela, 223p., 1995.

CHARACKLIS, W.G., COOKSEY, K.E. Biofilm and microbial fouling. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p.93-137, 1983.

COLQUHOUN, K.O., TIMMS, S., FRICKER, C.R. A simple method for the comparison of commercially available ATP hygiene monitoring systems. **Journal of Food Protection**, v.61, n.4, p.499-501, 1998.

COMBRUGGE, V.; WAES, G. Methods for assessing the bacteriological quality raw milk from the farm. ATP method. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.256, p.41-44, 1991.

COOK, F.K., PIERSON, D.M. Inhibition of bacterial spores by antimicrobials. **Food Technology**, v.37, n.11, p.127-134, 1983.

CORBITT, A.J., BENNION, N., FORSYTHE, S.J. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, n.6, p.443-447, 2000.

COSTA, P.D. **Avaliação da técnica de ATP-bioluminescência no controle do procedimento de higienização na indústria de laticínios**. Viçosa, MG: UFV, 2001, 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, USA, v.41, p. 435-464, 1987.

COWELL, B.A., WILLCOX, M.D.P., HERBERT, B., SCHNEIDER, R.P. Effect of nutrient limitation on adhesion characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.944-954, 1999.

DAVIDSON, C.A., GRIFFITH, C.J., PETERS, A.C., FIELDING, L.M. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP-bioluminescence and traditional hygiene swabbing. **Luminescence**, v.14, n.1, p.33-38, 1999.

DICKINSON, E. Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. **International Dairy Journal**, v.9, p.305-312, 1999.

DOORES, S. Bacterial spore resistance-species of emerging importance. **Food Technology**, v.37, n.11, p.127-134, 1983.

DOUGLAS, C.W.I., ROTHWELL, P.S. Evaluation of a hygiene monitor for detection of contamination in dental surgeries. **British Dental Journal**, v.170, p.331-335, 1991.

FLINT, S.H., BREMER, P.J., BROOKS, J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant – Description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, v.11, n.1, p.81-87, 1997.

FOEGEDING, P.M. Bacterial spore resistance to chlorine compounds. **Food Technology**, v.37, n.11, p.101-104, 1983.

GÂNDARA, A.L. e OLIVEIRA, J.S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p.1-7, 2000.

GIESE, J.H. Sanitation: the Key to food safety and public health. **Food Technology**, v.45, n.12, p.74-80, 1991.

GIOVA, D.A.T. **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos: análises de perigos e pontos críticos a qualidade e a segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 377p., 1997.

GOMBAS, D.E. Bacterial spore resistance to heat. **Food Technology**, v.37, n.11, p.105-110, 1983.

GÓMEZ, J.M.R. Applications of bioluminescence in the food industry. **Alimentación Equipos y Tecnología**, v.16, n.1, p.105-108, 1997.

GREEN, T.A., RUSSEL, S.M. e FLETCHER, D.L. Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. **Journal of Food Protection**, v.62, n.1, p. 86-90, 1999.

GRIFFITH, C.J., COOPER, R.A., GILMORE, J., DAVIES, C., LEWIS, M. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. **Journal of Hospital Infection**, v.45, p.19-28, 2000.

GRIFFITHS, M.W. Applications of bioluminescence in the dairy industry. **Journal Dairy Science**, v. 76, p.3118-3125, 1993.

HAMILTON, R.J. **Developments in oils and fats**. 1ªed., Glasgow: publicado por Blackie Academic & Professional, impresso por Chapman & Hall, 269 p., 1995.

HAWRONSKYJ, J.M., HOLAH, J. ATP universal hygiene monitor. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, p.79-84, 1997.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 787p., 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**; Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3^a ed., São Paulo, v.1, 533p., 1985.

JAYNE-WILLIAMS, D.J., FRANKLIN, J.G. Dairy Science Abstract, v.22, p.215, 1960. In: ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactologica: Microbiologia de la leche**. Zaragoza: Editora Acribia, v.1, p.9, 1987.

JEONG, D.K., FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v.57, n.7, p.576-586, 1994.

KENNEDY Jr., J.E., OBLINGER, J.L. Application of bioluminescence to rapid determination of microbial levels in ground beef. **Journal of Food Protection**, v.48, n.4, p.334-340, 1985.

KODAKA, H., FUKUDA, K., MIZUOCHI, S., HORIGOME, K. Adenosine triphosphate content of microorganisms related with food spoilage. **Japanese Journal of Food Microbiology**, v. 13, p.29-34, 1996.

KRYSINSKI, E.P., BROWN, L.J., MARCHISELLO, T.J. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v.55, n.4, p.246-251, 1992.

KUMAR, C.G., ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.9-27, 1998.

LINDEN, G., LORIENT, D. **Bioquímica Agroindustrial: Revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Zaragoza: Editora Acribia, 428 p., 1994.

LARSON, E.L., AIELLO, A.E., DUARTE, C.G., LIN, S.X., LEE, L., LATTA, P.D., LINDHARDT, C. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. **Food Microbiology**, v.20, p.735-739, 2003.

MARENA, C., LODOLA, L., BULGHERONI, A., CARRETO, E., ZECCA, M., MASERATI, R., ZAMBIANCHI, L. Assessment of handwashing practices with chemical and microbiological methods: preliminary results from a prospective crossover study. **American Journal of Infection Control**, v.30, n.6, p.334-340, 2002.

MARRIOT, N.G. **Principles of food sanitation**. 3rd ed. New York: Chapman & Hall, 421p., 1995.

MARSHALL, K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society of Microbiology News**, v.58, p.202-207, 1992.

MAW, S.J., FOWLER, V.R., HAMILTON, M., PETCHEY, A.M. Physical characteristics of pig fat and their relation to fatty acid composition. **Meat Science**, v.63, p. 185–190, 2003.

MISLIVEC, P.B., BEUCHAT, L.R., COUSIN, M. A. Yeast and molds. In: VANDERZANT, C., SPLITTSOESSER, D.F. (ed.) **Compendium of Methods to the Microbiological Examination of Food**. 3^a ed. Washington: APHA, cap. 16, p.239-250, 1992.

MONTEL, M.C., MASSON, F., TALON, R. Bacterial role in flavour development. **Meat Science**, v.49 (Suppl. 1), p. S111-S123, 1998.

MUNSON, T.E., SCHRADE, J.P., BISCIELLO, N.B., FANTASIA, L.D., HARTUNG, W. H., O'CONNOR, J.J. Evaluation of an automated fluorescent antibody procedure for detection of *Salmonella* in foods and feeds. **Applied Environment Microbiology**, v.31, p.514-521, 1976.

NAWAR, W.W. Características de los fluidos nutritivos de origen animal: leche. In: FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Editora Acribia. 1095p., 1993.

POULIS, J.A.; PIJPER, M.; MOSSEL, D.A.A.; DEKKERS, P.P.A. Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. **International Journal of Food Microbiology**, v.20, p.109-116, 1993.

PRICE, J.F., SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos**. 2ª ed. Zaragoza: Editora Acribia, 581 p., 1994.

RICHARDSON, T., McGANN, T.C.A., KEARNEY, R.D. Levels and locations of adenosine 5'-triphosphate in bovine milk. **Journal Dairy Research**, v.47, p.91-96, 1980.

ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactologica: Microbiologia de la leche**. Zaragoza: Editora Acribia, v.1, p.9, 1987.

ROCHA, C.F., VILELA, M.A.P., PINTO, C.L. Aspectos de higiene e métodos de avaliação de procedimentos de limpeza e sanificação na indústria de laticínios. **Revista do Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v.309, n.54, p.197-204, 1999.

SASAHARA, K.C., ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing system. **Journal of Food Protection**, v.56, n.12, p.1022-1028, 1993.

SCHWACH, T.S., ZOTTOLA, E. A. Scanning electron microscopy study on some effects of sodium hipoclorite on attachment of bacteria to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v.47, n.10, p.756-759, 1984.

SHEPERD, R.; ROBERTSON, A.; OFMAN, D. Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins. **Food hydrocolloids**, v.14, n.4, p.281-286, 2000.

SILVA, C.A.S. **Avaliação da Radiação Ultravioleta no controle de microrganismos aderidos em filmes de polietileno de baixa densidade**. Viçosa, MG: UFV, 2000, 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.

SNEATH, P.H.A. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: SNEATH, P., H., A.; MAIR, N., S.; SHARPE, M., E.; HOLT, J.G., ed. **Bergey's Manual Systematic Bacteriology**, 9^a ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986, v.2, p.1104-1206, 1986.

SONDERGAARD, A.K., STAHNKE, L.H. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum* – a comparative study in model systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.75, p.99-109, 2002.

SPLITTSOESSER, D.F. Direct microscopic count. In: VANDERZANT, C., SPLITTSOESSER, D.F. (ed.) **Compendium of Methods to the Microbiological Examination of Food**. 3^a ed. Washington: APHA, cap. 5, p.97-104, 1992.

STANNARD, C.J., WOOD, J.M. The rapid estimation of microbial contamination of raw meat by measurement of adenosine triphosphate (ATP). **Journal of Applied Bacteriology**, V.55, p.429-438, 1983.

STEVENSON, K.E., SHAFER, B.D. Bacterial spore resistance to hydrogen peroxide. **Food Technology**, v.37, n.11, p.111-114, 1983.

SUÁREZ , B., FERREIRÓS, C.M. Psychrotrophic flora of raw milk: resistance to several common disinfectants. **Journal Dairy Research**, v.58, n.1, p.127-136, 1991.

SWAISGOOD, H.E. Características de los fluidos nutritivos de origen animal: leche. In: FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Editora Acribia. 1095p., 1993.

SWANSON, K.M.J., BUSTA, F.F., PETERSON, E.H., JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C., SPLITTSOESSER, D.F. (editores) **Compendium of Methods to the Microbiological Examination of Food**. 3^a ed. Washington: APHA, cap. 4, p.75-96, 1992.

THORE, A., ANSÉHN, S., LUNDIN, A., BERGMAN, S. Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate. **Journal Clinical Microbiology**, v.1, p.1-8, 1975.

TROLLER, J.A. **Sanitation in food processing**. 2^a ed., New York: Academic Press, p.52-69, 1993.

TYDRICH, L. New applications for ATP bioluminescence methods. **Cereal Foods World**, v.41, n.6, p.463-465, 1996.

VANNE, L., KARWOSKI, M., KARPPINEN, S., SJOBERG, A.M. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. **Food Control**, v.7, n.6, p.263-276, 1996.

VELAZQUEZ, M., FEIRTAG, J.M. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. **Journal of Food Protection**, v.60, n.7, p.799-803, 1997.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1965-79, 1990.

WEBSTER, J.A., HALL, M.S., RICH, N., GILLILAND, S.E., FORD, S.R., LEACH, F.R. Improved sensitivity of the bioluminescent determination of numbers of bacteria in milk samples. **Journal of Food Protection**, v.51, n.12, p.949-954, 1988.

WEN, G., VORONEY, R.P., SCHOENAU, J.J., YAMAMOTO, T., CHIKUSHI, J. Assessment of ionic quenching on soil ATP bioluminescence reaction. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.1-7, 2001.

WHISTLER, R.L. e DANIEL, J.R. Carbohidratos. In: FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Editora Acribia. 1095p., 1993.

WOOD, J.D., BUXTON, P.J., WHITTINGTON, F.M., ENSER, M. **Livestock Production Science**, v.15, p.73, 1986.

ZOTTOLA, E.A., SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing – should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.125-148, 1994.

ZOTTOLA, E.A. Microbial attachment and biofilms formation: a new problem for the food industry? **Food Techonology**, v.28, n.7, p.107-114, 1994.

ZOTTOLA, E.A. Special techniques for studying microbial biofilmes in systems. In: TORTOELLO, M.L., GRENDDEL, S.M. (Eds.). **Food microbiologist analysis: new technologies**. Baltimore: IFT basic symposium series, p.315-343, 1997.

7. APÊNDICE

Quadro 1 - Resumo da análise de variância do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de caseína¹, lipídeo² ou sacarose³

FV	GL	QM
Substância	2	0,206763 *
Concentração/Substância	6	0,035030 ^{ns}
Repetição/Concentração/Substância	18	0,026278 ^{ns}
Duplicata/Repetição/Concentração/Substância	27	0,024524 ^{ns}

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

^{ns} Não significativo.

¹ Caseína nas concentrações 10,5; 7,0 ou 3,5 mg.mL⁻¹.

² Lipídeo nas concentrações 21,0; 14,0 ou 7,0 mg.mL⁻¹.

³ Sacarose nas concentrações 1,8; 1,2 ou 0,6 mg.mL⁻¹.

Quadro 2 – Resumo da análise de variância das comparações do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas^a

Comparações	GL	QM
Tratamentos	6	0,11472063 *
Caseína vs. Caseína + Sacarose	1	0,06406667 *
Caseína vs. Caseína + Lipídeo	1	0,07481667 *
Lipídeo vs. Caseína + Lipídeo	1	0,32201667 *
Lipídeo vs. Lipídeo + Sacarose	1	0,13201667 *
Sacarose vs. Caseína + Sacarose	1	0,00375000 ^{ns}
Sacarose vs. Lipídeo + Sacarose	1	0,06000000 *
Caseína + Sacarose vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo	1	0,20535000 *
Caseína + Lipídeo vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo	1	0,22426667 *
Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo	1	0,07260000 *
Resíduo	14	0,00283810

* Significativo a 1% de probabilidade (p<0,01).

^{ns} Não significativo.

^a Caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0; 14,0 e 1,2 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Quadro 3 - Resumo da análise de variância do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões de caseína¹, lipídeo² ou sacarose³ adicionada de *Staphylococcus carnosus*⁴

FV	GL	QM
Substância	2	2,124457*
Concentração/Substância	6	0,297893*
Repetição/ Concentração/Substância	18	0,032143
Duplicata/ Repetição/ Concentração/Substância	27	0,013354

* Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05).

¹ Caseína nas concentrações 10,5; 7,0 ou 3,5 mg.mL⁻¹.

² Lipídeo nas concentrações 21,0; 14,0 ou 7,0 mg.mL⁻¹.

³ Sacarose nas concentrações 1,8; 1,2 ou 0,6 mg.mL⁻¹.

⁴ *Staphylococcus carnosus* na concentração de 5,4x10⁴ CDM.mL⁻¹.

Quadro 4 - Resumo da análise de variância das comparações do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas adicionadas ou não de microrganismos^{ab}

Comparações	GL	QM
a) <i>Staphylococcus carnosus</i>		
Tratamentos	2	2,415744 *
Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + <i>Staphylococcus carnosus</i>	1	0,470400 *
<i>Staphylococcus carnosus</i> vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + <i>Staphylococcus carnosus</i>	1	2,148016 *
Resíduo	6	0,007478
b) Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>		
Tratamentos	2	0,014878 *
Caseína + Lipídeo + Sacarose vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	1	0,029400 *
Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> vs. Caseína + Lipídeo + Sacarose + Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	1	0,004816 ^{ns}
Resíduo	6	0,002578

* Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05).

^{ns} Não significativo.

^a Caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0; 14,0 e 1,2 mg.mL⁻¹, respectivamente.

^b *Staphylococcus carnosus* e esporos de *Bacillus subtilis* nas concentrações de 5,4x10⁴ CDM.mL⁻¹ e 2,9x10⁴ CDM.mL⁻¹, respectivamente.

Quadro 5 – Resumo da análise de variância das comparações do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas aderidas aos cupons de aço inoxidável AISI 304, n°4 ^a

Comparações	GL	QM
Tratamentos	6	0,048500 *
Caseína vs. Caseína+Sacarose	1	0,104017 *
Caseína vs. Caseína+lipídeo	1	0,093750 *
Lipídeo vs. Caseína+Lipídeo	1	0,020417 ^{ns}
Lipídeo vs. Lipídeo+Sacarose	1	0,018150 ^{ns}
Sacarose vs. Caseína+Sacarose	1	0,050417 ^{ns}
Sacarose vs. Lipídeo+Sacarose	1	0,040017 ^{ns}
Caseína+Sacarose vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo	1	0,147267 *
Caseína+Lipídeo vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo	1	0,135000 *
Lipídeo+Sacarose vs. Caseína+Sacarose+Lipídeo	1	0,135000 *
Resíduos	14	0,011386

* Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05).

^{ns} Não significativo.

^a Caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0; 14,0 e 1,2 µg.cm⁻², respectivamente.

Quadro 6 – Resumo da análise de variância das comparações do logaritmo decimal do número de Unidades Relativas de Luz de suspensões e soluções de substâncias orgânicas adicionadas ou não de microrganismos, aderidas aos cupons de aço inoxidável AISI 304, n°4 ^a

Comparações	GL	QM
Tratamentos	12	1,057915 *
Caseína + Sacarose + Lipídeo vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^3$ CDM.cm ⁻²)	1	0,084017*
<i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^3$ CDM.cm ⁻²) vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^3$ CDM.cm ⁻²)	1	1,297350*
Caseína + Sacarose + Lipídeo vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^2$ CDM.cm ⁻²)	1	1,510017*
<i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^2$ CDM.cm ⁻²) vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^2$ CDM.cm ⁻²)	1	0,470400*
Caseína + Sacarose + Lipídeo vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^1$ CDM.cm ⁻²)	1	3,300417*
<i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^1$ CDM.cm ⁻²) vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + <i>Staphylococcus carnosus</i> ($5,4 \times 10^1$ CDM.cm ⁻²)	1	0,006667 ^{ns}
Caseína + Sacarose + Lipídeo vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^3$ CDM.cm ⁻²)	1	3,985350*
Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^3$ CDM.cm ⁻²) vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^3$ CDM.cm ⁻²)	1	0,006667 ^{ns}
Caseína + Sacarose + Lipídeo vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^2$ CDM.cm ⁻²)	1	4,489350*
Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^2$ CDM.cm ⁻²) vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^2$ CDM.cm ⁻²)	1	0,022817*
Caseína + Sacarose + Lipídeo vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^1$ CDM.cm ⁻²)	1	5,041667*
Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^1$ CDM.cm ⁻²) vs. Caseína + Sacarose + Lipídeo + Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> ($2,9 \times 10^1$ CDM.cm ⁻²)	1	0,026667*
Resíduo	26	0,003354

* Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05).

^{ns} Não significativo.

^a Caseína, lipídeo e sacarose nas concentrações de 7,0, 14,0 e 1,2 µg.cm⁻², respectivamente.