

**PATRÍCIA DOLABELA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA NO CONTROLE  
DO PROCEDIMENTO DE HIGIENIZAÇÃO NA INDUSTRIA DE LATICÍNIOS**

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

2001

**PATRÍCIA DOLABELA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA NO CONTROLE  
DO PROCEDIMENTO DE HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

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: 04 outubro de 2001

---

Prof. Frederico José Vieira Passos  
(Conselheiro)

---

Prof. Sebastião C. Cardoso Brandão  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Valéria P. Rodrigues Minin

---

Prof<sup>a</sup>. Edna Fröeder Arcuri

---

Prof. Nélio José de Andrade  
(Orientador)

A Deus, por esta oportunidade.

Aos meus pais Sebastião e Maria de Lourdes pelo amor, pelas palavras de consolo e pelos braços estendidos em minha direção em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos Anderson e Bruno pelo grande apoio.

Ao meu querido e amado Sebastião Marcos pelos conselhos, apoio, amizade e incentivo sempre presente.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

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

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Nélio José de Andrade, pela orientação, pela confiança, pela amizade, pelo apoio e ensinamentos imprescindíveis para realização deste trabalho.

Ao professor Sebastião Cardoso Brandão, pela colaboração e pelas sugestões.

Ao professor Frederico José Viera Passos, pela atenção, avaliação crítica do trabalho e pelas sugestões apresentadas.

A professora Maria Cristina Vanetti, do Departamento de Microbiologia/UFV, pelo fornecimento da cepa empregada neste trabalho.

A todos os amigos e amigas em especial à Cleusa, Kelly, Carolina, Aurélia, Marciana, Elisângela, Cleuber, Barancio, Marcelo, Keily, Angélica, Márcio e Valéria.

Às minhas companheiras de “república” Roberta, Àvila, Geovana, Alice e Beth pela amizade, apoio e companheirismo.

A todos os funcionários do DTA e em especial à Geralda, Luiz, Carlinhos, Manoel, Antônio Tito, Cláudio e Perereca.

Aos funcionários do Laticínios/FUNARBE/UFV e em especial ao “Sr.Lelé”, Sr. Silvério e ao Luiz.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

PATRÍCIA DOLABELA COSTA, filha de Sebastião da Costa Martins e Maria de Lourdes Dolabela Costa, nasceu em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, em 20 de janeiro de 1973.

Em agosto de 1999, graduou-se em Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 1999, iniciou o curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

## ÍNDICE

LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Avaliação do procedimento de higienização.....	4
2.2. Qualidade e tratamento de água na indústria de alimentos.....	9
2.3. Adesão microbiana e formação de biofilmes.....	13
2.4. Higienização nas indústrias de alimentos.....	15
2.5. Etapas da higienização .....	18
2.5.1. Pré-lavagem.....	18
2.5.2. Lavagem com detergentes.....	18
2.5.3. Enxágue.....	19
2.5.4. Sanificação.....	19

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Avaliação da qualidade microbiológica da água pela técnica de ATP-bioluminescência.....	21
3.1.1. Seleção das amostras.....	21
3.1.2. Análises físico-químicas e microbiológicas .....	22
3.1.3. Técnica da bioluminescência para análise de água.....	22
3.2. Adesão microbiana em superfícies usando a técnica de ATP-bioluminescência e contagem padrão em placas.....	23
3.2.1. Microrganismos avaliados.....	23
3.2.2. Suspensão de esporos de <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	23
3.2.3. Suspensão de <i>Escherichia coli</i> k12.....	24
3.2.4. Adesão de <i>Bacillus sporothermodurans</i> nos cilindros de aço inoxidável.....	25
3.2.5. Adesão de esporos de <i>Bacillus sporothermodurans</i> no polietileno	26
3.2.6. Adesão de <i>Escherichia coli</i> k12 no aço inoxidável.....	26
3.2.7. Técnica de ATP-bioluminescência para os microrganismos aderidos em aço inoxidável e em polietileno de baixa densidade.....	27
3.3. Avaliação do procedimento de higienização em linha de pasteurização de leite, usando a técnica de ATP-bioluminescência e contagem padrão em placas.....	27
3.4. Avaliação dos resultados.....	29
3.4.1. Avaliação da qualidade microbiológica da água.....	29
3.4.2. Avaliação do processo de adesão em superfícies.....	30
3.4.3. Avaliação do procedimento de higienização em linha de pasteurização de leite.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Seleção das amostras de água de tratamento convencional e de uso em Laticínios para o teste de ATP-bioluminescência.....	31
4.2. Análise da qualidade microbiológica da água pelas técnicas de bioluminescência e contagem de mesófilos e coliformes totais.....	34
4.3. Avaliação de adesão microbiana em superfície de aço inoxidável e polietileno pela técnica de bioluminescência .....	39

4.4. Avaliação do procedimento de higienização em linha de leite pasteurizado pelas técnicas da bioluminescência e contagens de aeróbios mesófilos .....	43
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE.....	60

## LISTA DE QUADROS

1.	Alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos Portaria nº 1469/2000 do Ministério da Saúde.....	9
2.	Principais doenças relacionadas à ingestão de água contaminada e seus agentes etiológicos.....	10
3.	Análise físico-químicas de águas originárias do tratamento convencional da ETA/UFV e de uso em indústria de Laticínios. Média de três repetições.....	32
4.	Análises microbiológicas de águas originárias do tratamento convencional da ETA/UFV e de uso em indústria de laticínios. Média de três repetições.....	33
5.	Análises físico-químicas das águas selecionadas para a avaliação da técnica de bioluminescência. Média de três repetições.....	35
6.	Resumo das análises de variância dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) da concentração de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total, livre e microbiano, de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de mesófilos por mL e de Número Mais Provável (NMP) de coliformes por 100 mL de amostras de água de manancial, resfriamento de amônia e industrial	35

7. Média da concentração dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total, livre e microbiano, de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL e de Número Mais Provável (NMP) por 100 mL de amostras de água de manancial, resfriamento de amônia e industrial. Média de três repetições.....	36
8. Logaritmo decimal ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total e UFC/mL em superfícies de aço inoxidável e polietileno aderidos com esporos de <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	39
9. Logaritmo decimal ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total, livre e microbiano e UFC/cm <sup>2</sup> presente em superfícies de aço inoxidável aderidos com suspensão de <i>Escherichia coli</i> K12.....	41
10. Análise de variância dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total em diferentes superfícies de uma linha de pasteurização de leite, antes e após o procedimento de higienização.....	44
11. Análise de variância dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) de contagem de mesófilos aeróbios, expressa em UFC/cm <sup>2</sup> , em diferentes superfícies de uma linha de pasteurização de leite, antes e após o procedimento de higienização.....	44
12. Médias dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas Luz (URL) para ATP total em diferentes superfícies de uma linha de pasteurização de leite, antes e após o procedimento de higienização.....	45
13. Médias dos logaritmos decimais da contagem de mesófilos aeróbios, expressa em UFC/cm <sup>2</sup> , em diferentes superfícies de uma linha de pasteurização de leite, antes e após o procedimento de higienização.....	46
14. Porcentagem de superfícies considerada não higienizadas por diferentes recomendações. .....	48

## LISTA DE FIGURAS

1. Esquema da formação da luz pela reação entre ATP e o complexo enzimático luciferina/luciferase..... 7
2. Técnica adequada para remoção de ATP na superfície de equipamentos e utensílios, mostrando a forma de segurar o swab, o ângulo e movimento circular do swab..... 28
3. Técnica adequada para remoção de ATP na superfície de equipamentos e utensílios, mostrando a área e a forma em diagonal para a coleta..... 28

## RESUMO

COSTA, Patrícia Dolabela, M.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2001. **Avaliação da técnica de ATP-bioluminescência no controle do procedimento de higienização na indústria de laticínios.** Orientador: Nélio José de Andrade. Conselheiros: Sebastião César Cardoso Brandão e Frederico José Viera Passos.

Foram avaliadas pela técnica de ATP-bioluminescência i) a qualidade microbiológica da água do manancial de captação para tratamento na ETA/UFV, da água de resfriamento de amônia e da água industrial de uso em um laticínio, ii) a adesão de *Escherichia coli* K12 e de esporos de *Bacillus sporothermodurans*, em suspensões, contendo cerca de  $10^4$  e  $10^6$  UFC/mL, em aço inoxidável e em polietileno de baixa densidade a 37°C e tempo de adesão de 24h. e, iii) o procedimento de higienização em superfícies de caminhão tanque, tanque de resfriamento de leite cru, tanque de equilíbrio do pasteurizador, desnatadeira, tanque de armazenamento de leite pasteurizado e tanque de equilíbrio para empacotamento de leite pasteurizado. Nas águas foram efetuadas, também, as contagens de mesófilos aeróbios, expressos em UFC/mL e coliformes totais, expressos em NMP/100mL. Nas superfícies foram determinados os números de mesófilos aeróbios aderidos, expressos em

UFC/cm<sup>2</sup>. Foi utilizado o luminômetro UNILITEX-cel (BIOTRACE), para os testes de determinação de ATP, expressos em Unidades Relativas de Luz (URL), incluindo ATP total e livre. Em relação à água industrial, houve a concordância entre os métodos de bioluminescência e de contagem de mesófilos aeróbios e coliformes totais. As amostras de água de manancial e de resfriamento não apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey, para as quantidades de ATP total, livre e também para as contagens microbianas. Constataram-se concentrações de ATP microbiano diferentes para essas amostras de água. Os resultados indicam que teste de ATP total é mais recomendado e sugerem que qualidade físico-química da água diminui a medida de luz. A bioluminescência não foi apropriada para avaliar a presença de esporos de *B. sporothermodurans* e de *E. coli* nas superfícies avaliadas. A determinação das URL foi afetada pelas condições de adesão da *E. coli*. Os resultados mostram que tanto a concentração de ATP total e a contagem de mesófilos aeróbios foram diferentes ( $p < 0,05$ ) quando se comparou antes - 9772 URL e  $1,20 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> - e após - 2511 URL e  $1,10 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup> - o procedimento de higienização. A bioluminescência considerou 100% das superfícies em condições higiênicas insatisfatórias e contagem em placas apenas detectou 50%, considerando a recomendação da APHA e 28% a recomendação da OMS. Não houve concordância entre bioluminescência e a contagem microbiana na classificação quanto às condições higiênicas das diferentes superfícies. Observou-se grande variação na leitura de URL, sugerindo a necessidade de se efetuar mais de uma análise na superfície avaliada. A técnica de ATP-bioluminescência pode ser usada como indicadora das boas condições de limpeza, não apresentando relação com a contagem microbiana, indicando também a possibilidade de adesão microbiana e formação de biofilmes.

## ABSTRACT

COSTA, Patrícia Dolabela, M.S., Universidade Federal de Viçosa, October 2001. **Evaluation of ATP-bioluminescence techniques for hygiene monitoring in the dairy industry**. Adviser: Nélio José de Andrade. Committee Members: Sebastião César Cardoso Brandão and Frederico José Vieira Passos.

ATP-bioluminescence techniques were used to evaluate i) the microbiological quality of the ETA/UFV, treatment water, ammonia-cooling water and industrial water at a dairy, ii) the adhesion of *Escherichia coli* K12 and *Bacillus sporothermodurans* spores, in suspensions containing around  $10^4$  to  $10^6$  UFC/mL on stainless steel, at 37°C and adhesion time of 24 h and, iii) hygiene monitoring of truck surfaces, raw milk cooling tanks, pasteurizing tanks, milk centrifuge, pausterized milk storing tank and pausterized milk packaging tank. Aerobic mesophyllic and total coliform countings were also conducted in the water samples, respectively, expressed as UFC/mL and NMP/100 mL. The numbers of *Aerobic* mesophylls, expressed in UFC/cm<sup>2</sup> were determined on the surfaces. The UNILITEX-cel (Biotrace) luminometer was used for determining ATP, expressed as Relative Units of Light (RUL), including total and free ATP. For industrial water, there was an agreement between the bioluminescence and the counting methods of aerobic mesophylls and total

coliforms Treatment and cooling water samples did not present any difference ( $p \geq 0.05$ ) by the Tukey test for total and free ATP amounts nor for the microbial countings. Different microbial ATP concentrations were found for these water samples. The results indicate that the total ATP test is more adequate, suggesting that the physical chemical quality of water decreases light measurement. Bioluminescence was not appropriate to evaluate the presence of *B. sporothermodurans* and *E. coli* spores on the surfaces evaluated. RUL determination was affected by *E. coli* adhesion conditions. The results show that both total ATP and aerobic mesophyll countings were different ( $p < 0.05$ ) when hygiene monitoring was compared before - 9772 RUL and  $1.20 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> - and after - 2511 RUL and  $1.10 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>. Bioluminescence considered 100% of the surfaces to be under inadequate hygiene conditions while plate counting detected only 50%, based on APHA recommendation and 28%, based on WHO recommendation. There was no agreement between bioluminescence and microbial counting for hygiene condition classification under different surfaces. A great variation in RUL reading was observed, suggesting the need to carry out more than just one analysis on the surface evaluated.

## 1. INTRODUÇÃO

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, como o MERCOSUL, consumidores mais exigentes e os relatos de doenças veiculadas por alimentos, particularmente àquelas de origem bacteriana.

A qualidade da água utilizada nas indústrias de alimentos é de grande importância, visto que participa de todas as etapas do processamento de alimentos, incluindo a limpeza e sanificação de equipamentos, utensílios, manipuladores e ambientes de processamento. Deve-se, portanto, ter controle sobre as qualidades físico-químicas e microbiológicas da água para que não interfira nas qualidades sensoriais e organolépticas dos alimentos produzidos.

Na indústria de alimentos, a higienização tem contribuído para a preservação da pureza e da qualidade microbiológica dos alimentos, auxiliando, portanto na obtenção de um produto que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, tenha uma boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo riscos à saúde do consumidor.

Uma superfície mal higienizada mais a capacidade de adesão de microrganismos podem ser fontes potenciais de possíveis contaminações, podendo ocorrer a formação de biofilmes. Estes, uma vez formados, são de difícil remoção pelos procedimentos comuns de higienização. Além disso, uma outra consequência de uma má higienização é a possível ocorrência de doenças de origem alimentar, sendo um dos problemas que mais afligem os profissionais desta área. Cerca de 200 doenças podem ser veiculadas pelos alimentos provocadas por bactérias, fungos, vírus, parasitas, agentes químicos e substâncias tóxicas de origem animal e vegetal. As bactérias representam o grupo de maior importância respondendo, pela ocorrência de cerca de 70% dos surtos e 95% dos casos de doenças de origem alimentar (BAWART, 1986).

A realização de um procedimento de higienização correto contribui para evitar a formação de biofilmes e a ocorrência de doenças de origem alimentar. Para isso, a higienização é dividida em duas etapas bem definidas e que deve ser respeitada para obtenção de alimentos seguros: (a) 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 (b) a sanificação que tem como objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos alteradores para níveis considerados seguros.

Uma preocupação das indústrias de alimentos é com a avaliação dos procedimentos de higienização de equipamentos de processamento de alimentos, e superfícies de contato direto com os mesmos. Para atender essas necessidades das indústrias, a avaliação deve gerar resultados rápidos, permitindo assim, um controle efetivo do procedimento de higienização. Por exemplo, os métodos microbiológicos convencionais são demorados, não permitindo uma avaliação imediata dos processos de limpeza e sanificação.

Os métodos tradicionais como plaqueamento em agar, usando swab, são trabalhosos e demorados e não detectam presença de resíduos nas superfícies. Estes resíduos são fonte de contaminação, podendo levar a formação de biofilme, além de proteger os microrganismos da ação de sanificantes. Por isso, o uso de métodos rápidos, sensíveis e precisos de detecção e/ou enumeração de contaminação microbiana e resíduos orgânicos em superfície tem sido avaliado no controle dos procedimentos de higienização na indústria de alimentos.

A bioluminescência é uma técnica relativamente nova e que consiste em determinar a quantidade de ATP presente na superfície do equipamento. Também, tem sido aplicada para a enumeração de população bacteriana em água, águas residuárias e diversos. Principalmente, tem sido usada para monitorar os procedimentos de higienização nas indústrias de alimentos.

Neste trabalho, foi usada a técnica de ATP-bioluminescência tendo como padrão a contagem em placas, para avaliar qualidade de águas de abastecimento público e industrial, a adesão bacteriana em aço inoxidável e em polietileno de baixa densidade e o procedimento de higienização em equipamentos e utensílios de uma linha de pasteurização de leite.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Avaliação do procedimento de higienização

A segurança dos alimentos tem se tornado um item de preocupação cada vez maior, tanto para os consumidores quanto para os órgãos governamentais responsáveis pela saúde pública. Como consequência, tem aumentado 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 (BARRICHELLO e ALLIL, 1997).

Com isso, avaliação do procedimento de higienização de equipamentos e utensílios, que entram em contato direto com os alimentos, é uma preocupação constante das indústrias de alimentos, que necessitam de resultados rápidos para garantir a qualidade dos produtos processados e a segurança dos consumidores.

A redução da vida-de-prateleira de leite pasteurizado é devido principalmente a microrganismos contaminantes de pós-pasteurização, como as bactérias gram-negativas particularmente *Pseudomonas* ssp. A presença destas bactérias deteriorantes em sistemas de processamento de leite é geralmente devido a programa inadequado de limpeza e sanificação. A limpeza insuficiente deixa resíduos de leite nas superfícies dos equipamentos, permitindo o crescimento de microrganismos contaminantes e alteradores (MURPHY et al, 1998).

Os métodos tradicionais de análises microbiológicas, como a contagem padrão em placas são trabalhosos além de demorados, precisando de um tempo de incubação de 24 a 72 horas. Este tempo retarda a detecção de

condições sanitárias insatisfatórias e contaminações microbianas que podem afetar a segurança dos produtos (KENNEEDY e OBLINGER, 1985). Além disso, esses métodos não detectam a presença dos resíduos que permanecem nas superfícies após a higienização, podendo ser fonte de contaminação de alimentos e diminuir a eficiência dos sanificantes.

Para atender as necessidades das indústrias de alimentos têm sido desenvolvidos métodos rápidos, sensíveis e precisos para a enumeração de microrganismos e a detecção de resíduos orgânicos, (KENNEEDY e OBLINGER, 1985, HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997). Dentre estes métodos rápidos, podem-se destacar: métodos biofísicos, baseados em crescimento ou metabolismo microbiano, radiometria, impedância e microcalorimetria, e a técnica de ATP (Adenosina Trifosfato) bioluminescência. Esse último tem como princípio a determinação da quantidade de ATP presente sobre as superfícies avaliadas, seja este ATP de origem microbiana ou não (KENNEEDY e OBLINGER, 1985; TYDRICH, 1996; GRIFFITHS, 1993; GIESE, 1991).

Várias informações , como as mencionadas abaixo, são fundamentais para o uso e entendimento da técnica do ATP-bioluminescência (COMBRUGGE e WAES, 1991a; BARRICHELLO, 1997, TYDRICH, 1996)

Todas as células vivas contém moléculas de ATP, incluindo células da pele, do sangue, de plantas e microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. O ATP é um nucleotídeo que está presente em toda célula viva e que é utilizado por estas como fonte de energia. O uso de ATP para medir a qualidade bacteriológica fundamenta-se no fato de que todas as células vivas contém ATP o que não ocorre com as células não viáveis. Além disso, o conteúdo intracelular de ATP em todas as bactérias, é em média um fentograma ( $10^{-15}$  g) de ATP por bactéria, podendo variar de 0,1 a 5,5. Há várias razões para a variação deste conteúdo entre as bactérias: depende da fase do crescimento celular, onde há baixo conteúdo na fase estacionária, em relação às outras. Também mudanças na taxa metabólica afetam o nível de ATP, e, conseqüentemente situações subótimas e de estresse podem alterar o seu conteúdo. A alteração do conteúdo de ATP na célula microbiana pode ser causada pela forma de extração do mesmo. O ATP pode ser originado de uma variedade de alimentos. A técnica de ATP- bioluminescência determina a presença de ATP, seja de origem microbiana ou não .

A técnica de ATP bioluminescência usada para a determinação do número de bactérias em leite, determinou um limite de detecção de  $10^5$  bactérias/mL em amostras filtradas e tratadas com NRB<sup>TM</sup> (Nucleotide Releasing Reagent for Bacteria). O método foi capaz de dar os resultados em 20 minutos. A correlação (r) com o método padrão foi de 0,95 e com significância de 5% (WEBSTER et al.,1988).

O método de bioluminescência, quando comparado com o método de contagem padrão em placas, pode gerar resultados em cerca de 45 minutos, e um laboratorista pode analisar de 20 a 30 amostras por hora, dependendo do método empregado e, ou, dos equipamentos utilizados (CROMBRUGGE e WAES, 1991a,b).

Em relação às superfícies, esta técnica envolve a remoção de ATP com swab esterilizado, que é colocado em contato com um complexo luciferina/luciferase, extraído de cauda do vaga-lume da espécie *Photinus pyralis* ou de peixes abissais (Figura 1) (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 ATP um fóton de luz é emitido. A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de ATP presente, que pode ser de origem microbiana ou não (HAWRONSKYJ e HOLAH,1997; GIESE, 1991). A medida de ATP-bioluminescência é afetada por certos fatores que causam redução nos fótons. A reação acontece em pH ótimo de 7,75, sendo que se o pH estiver abaixo ou acima do ótimo ocorre uma diminuição de luz. A temperatura ótima é de 25<sup>0</sup>C, à temperaturas mais elevadas a luciferase pode estar inativada e à temperaturas mais baixas a reação é lenta, além disso, a turbidez e a cor, por exemplo, no caso de análise de água, causam também a diminuição de luz (TYDRICH, 1996; COMBRUGGE e WAES, 1991a). Os instrumentos disponíveis para medir a luminescência são fotômetros sensíveis à emissão de luz. A instrumentação é relativamente simples, onde a maior parte dos instrumentos usados são baseados na detecção de luz por fotomultiplicadores. A amostra é colocada numa câmara escura para proteger o fotomultiplicador e o amplificador de luz externa. Os resultados são usualmente dados em unidades relativas de luz (URL) (HAWRONSKYJ e HOLAH,1997; COMBRUGGE e WAES, 1991a).

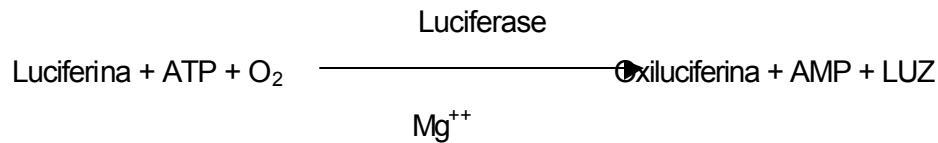


Figura 1 - Esquema da formação de luz pela reação entre ATP e o complexo enzimático luciferina/luciferase.

Os sistemas de bioluminescência são atualmente usados em ciências de alimentos para a detecção da presença de bactérias, avaliação do processo de higienização empregado e contaminantes em alguns sistemas de alimentos como: cervejaria, laticínios, carne, bebidas, aves e processamento de águas (GRIFFITHS, 1993; VELAZQUEZ e FEIRTAG, 1997; KENNEDY e OBLINGER, 1985; TYDRICH, 1996). Cerca de seis marcas comerciais desses equipamentos são comercializados no Brasil, que apresentam sensibilidade e reprodutibilidade diferentes (COLQUHOUN et al., 1998).

A técnica ATP-bioluminescência apresenta diversas vantagens (TYDRICH, 1996): i) é rápida na obtenção dos resultados, permitindo eliminar o problema antes do processamento, ii) é simples e de fácil uso, e iii) demanda pequena necessidade de laboratório. Porém, há algumas desvantagens: i) interferência do ATP de origem não microbiano, ii) não informa a presença de microrganismos patogênicos, iii) apenas partes acessíveis do equipamento podem ser analisadas, iv) a presença de detergentes ou outros agentes químicos pode interferir na reação, e v) sobretudo é uma técnica cara quando comparada com as tradicionais.

A presença do ATP não-microbiano é um fator de interferência, podendo este problema ser contornado, utilizando produtos que extraem o ATP de origem não bacteriana e o destroem enzimaticamente junto com qualquer outro ATP livre. Estes tipos de reagentes são disponíveis comercialmente, como o NRS<sup>®</sup>, Lumac e o NAS<sup>®</sup>. (STANNARD e WOOD, 1983). Os microrganismos podem ser separados da amostra do alimento por filtração ou centrifugação, podendo-se assim, quantificar apenas o ATP microbiano.

VELAZQUEZ e FEIRTAG (1997) analisaram o efeito do resíduo do hipoclorito de sódio nas concentrações de 100 a 5000 mg/L de cloro residual livre (CRL), com o pH variando de 7,22 a 12,14 e de 25 a 800 mg/L de um composto quaternário de amônia com pH entre 5,81 a 6,25 em amostra contendo  $10^8$  UFC/mL de *Escherichia coli* O157: H7 na medida de URL. Observaram que os resíduos da concentração de 100 mg/L de CRL aumentaram ligeiramente a medida de URL e não detectaram diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre os resíduos da concentração de 500 e 1000 mg/L de CRL com o controle. Os resíduos das concentrações de 10000 e 50000 mg/L de CRL diminuíram a leitura de ATP bioluminescência. Os resíduos das concentrações 100, 500 e 1000 mg/L de CRT não diminuíram a medida de ATP, além de não serem efetivos contra *E. coli* O 157:H7. Se estes microrganismos estivessem presentes nas superfícies, seriam detectados pela técnica, exigindo para isso um novo procedimento de higienização. O composto quaternário de amônia provocou um aumento de 10% na avaliação de URL nas concentrações avaliadas, sendo efetivo contra a *E. coli* somente a 800 mg/L, o que não constitui um risco, pois a superfície seria considerada suja necessitando, portanto, de um processo de higienização mais rigoroso.

Pesquisa que analisou o hipoclorito de sódio nas concentrações de 30, 50 e 70 mg/L de CRL e composto quaternário de amônia com 10,20 e 30 mg/L, observou que os dois sanificantes não influenciaram na medida de ATP bioluminescência, do controle e das amostras utilizando esses sanificantes. Já para ácido láctico houve reduções significativas na medida de ATP. Níveis de ácido láctico de 0,5% reduziram a medida de URL em 75%. As reduções na medida de ATP foram às mesmas para as concentrações de 1% e 2% (GREEN et al., 1998).

Sanificantes e agentes de limpeza são formulados para destruir microrganismos e ou remover resíduos formados em superfícies de equipamentos em plantas de processamento de alimentos. Os sanificantes e agentes de limpeza reagem com matérias orgânicas como gordura, proteína e também com componentes celulares, com as membranas.

Segundo GREEN et al., 1999 estes estudos demonstram que exposto os compostos para uso da técnica ATP-bioluminescência – o complexo

enzimático luciferina/luciferase- diretamente com sanificantes e agentes de limpeza há possibilidade de alterações na medida de URL.

## 2. 2. Qualidade e tratamento de água na indústria de alimentos

A água usada na indústria de alimentos deve atender aos padrões de potabilidade, em suas características físicas, químicas, microbiológicas, exigidas pela Portaria 1469/2000, do Ministério Saúde (BRASIL, 2001). São aproximadamente 90 parâmetros que devem ser avaliados para determinar a potabilidade da água. O Quadro 1 mostra os valores máximos permitidos para alguns desses parâmetros.

Quadro 1 - Alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos para água potável segundo a Portaria 1469/2000 do Ministério da Saúde.

Parâmetro	VMP
Sabor/odor	Não objetável
pH	6,5-8,5
Cor (UH)*	5
Turbidez (UT)**	1
Dureza (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	500
Cloro residual (mg/L Cl <sub>2</sub> )	< 2
Cromo (mg/L)	0,05
Cloretos (mg/L)	250
Nitrato (mg/L)	10
Nitrito (mg/L)	1
Benzeno (µg/L)	5
Trihalometanos totais (µg/L)	100
Coliformes totais (NMP/100 mL)	< 2
Coliformes fecais (NMP/100 mL)	< 2

VMP =Valor máximo permitido

\* Unidade Hazen (mg PtCo/L)

\*\* UT Unidades de turbidez

O controle de qualidade de água destinada ao consumo humano, nos sistemas produtores (mananciais, captação, tratamento) e nos sistemas de distribuição (reservatório, redes), normalmente é realizado pela empresa responsável de saneamento local e monitorada pelas Secretárias de Saúde Estaduais. Este monitoramento é estabelecido pela Resolução nº20 (BRASIL, 1986) e a Portaria nº1469/2000 (BRASIL, 2001) do Ministério da Saúde sendo os padrões de água potável restritos ao trecho que se inicia na captação e termina nas ligações domiciliares dos consumidores (D' AGUILA et al., 2000).

A água não tratada corretamente pode veicular um grande número de doenças. Algumas são mencionadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Principais doenças relacionadas à ingestão de água contaminada e seus agentes etiológicos.

Doenças	Agente causador
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>
Disenteria bacilar	<i>Shigella</i> sp.
Febre tifóide	<i>Salmonella typhi</i>
Hepatite infecciosa	Vírus da hepatite tipo A
Febre paratifóide	<i>Salmonella paratyphi</i> A, B e C
Gastroenterite	Outros tipos de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>
Diarréia infantil	Tipos enteropatogênicos de <i>Escherichia coli</i>
Leptospirose	<i>Leptospirase</i> sp.

Fonte : D'Aguila et al., 2000.

Para atingir os padrões de potabilidade, a água, coletada em diferentes mananciais, como lagoas, rios e represas, é submetida ao tratamento convencional nas Estações de Tratamento (ETA's). A água dos mananciais deve estar em condições de ser potabilizada, necessitando atender as exigências, quanto aos aspectos físicos, químicos e microbiológicos exigidos pela legislação, conforme a Resolução nº20, do MS de 1986 (BRASIL, 1986). A água, geralmente, é potabilizada por meio das etapas da

sedimentação simples, sedimentação com agentes coagulantes, floculação, decantação e filtração.

Um tratamento de água sempre se inicia com a remoção de matérias que flutuam ou estão suspensas, com uso de grade e telas. Isto ocorre nos mananciais, como lagos e lagoas, onde também ocorre a sedimentação de partículas maiores. Esta sedimentação simples é um fenômeno pelo qual as partículas em suspensão na água, que conferem turbidez, tendem a descer sob ação da gravidade. A principal vantagem da água armazenada é que as bactérias causadoras de doenças diminuem em número, devido à falta adequada de nutrientes e à ação desinfetante da radiação ultravioleta emitida pela luz solar. A sedimentação simples é adequada como processo de purificação apenas para águas relativamente puras, sendo útil como processo preliminar aos tratamentos posteriores da turbidez, ocasionada por partículas muito pequenas (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

A sedimentação simples não tem condições de remover a cor da água que é causada por substâncias dissolvidas ou em estado coloidal. Para isto, há a necessidade da adição de agentes coagulantes à água, que formam um precipitado insolúvel gelatinoso, floculento, que neutraliza e se combina com as partículas carregadas negativamente.

Adição dos agentes coagulantes à água, como sulfato de alumínio e sulfato ferroso, reagem com sua alcalinidade natural, ou adicionada para a formação de polímeros, como o hidróxido de alumínio ou hidróxido férrico. Esses hidróxidos formados possuem carga superficial positiva, e neutralizam as cargas negativas dos colóides, encapsulando-os. Os flóculos por serem mais densos precipitam, deixando a água livre de turbidez e cor (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Após a decantação, a água passa pelo processo de filtração que consiste em fazê-la atravessar camadas de material poroso, geralmente, areia de granulometrias diferentes. O processo de filtração é responsável pela remoção de partículas grandes nas superfícies da areia e na sedimentação e adsorção nos espaços vazios que se criam entre os grãos de areia. Estes espaços atuam como câmaras diminutas de sedimentação, nas quais as forças de gravidade, da atração gravitacional das partículas de matéria e a atração

eletrostática entre as partículas de cargas diferentes, levam as partículas em suspensão a aderirem às paredes dos espaços vazios.

A etapa de filtração é eficiente no processo de remoção parcial dos microrganismos da água, mas não é suficiente para garantir a qualidade microbiológica de uma água. Assim, a desinfecção tem por finalidade a destruição de microrganismos presentes na água, como bactérias, vírus e protozoários. Basicamente, o processo de desinfecção pode ser efetuado por agentes físicos, como a radiação ultravioleta, e principalmente, por agentes químicos, como os compostos clorados e ozônio.

A desinfecção é fundamental para o controle bacteriano na água. Por exemplo, espécies de bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, representantes do grupo denominado de psicrotóxicos, se desenvolvem à baixas temperaturas, e quando presentes na água poderão alterar produtos, inclusive aqueles refrigerados. A desinfecção também contribui para o controle de espécies de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* e de outras espécies esporuladas originárias basicamente do solo que são patogênicas ou alteradoras de alimentos (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

A água apresenta uma ampla utilização na indústria de alimentos, por exemplo, na limpeza e sanificação de equipamentos, limpeza de produtos, das matérias-primas, preparo de xaropes e salmouras, resfriamento, produção de vapor, entre outros (ANDRADE e MARTYN, 1982). As impurezas da água podem originar sérios problemas operacionais na indústria de alimentos e provocar a formação de depósitos e incrustações em várias superfícies e diversos tipos de corrosão de metais, em função de suas características químicas.

A qualidade da água na indústria de alimentos deve ser garantida do mesmo modo que uma matéria-prima ou ingrediente (PORETTI, 1990). O uso de água de qualidade microbiológica insatisfatória nas indústrias de alimentos pode originar alterações microbianas nos produtos elaborados, além de possibilitar a presença de patógenos, colocando em risco a saúde do consumidor, além disso, a água de qualidade microbiológica inadequada pode inviabilizar a obtenção de produtos que atendam os padrões microbianos exigidos pela legislação em vigor (WEI et al., 1985).

### 2.3. Adesão microbiana e a formação de biofilmes

Falhas em procedimentos de higienização dentro da indústria de alimentos permitem que os resíduos orgânicos fiquem aderidos às superfícies de equipamentos e que sejam fontes potenciais de contaminação. A partir daí, haverá condições para a ocorrência de processos de aderência de microrganismos, devido às forças físico-químicas de atração entre as células e as superfícies. Se esta deposição for fixada irreversivelmente por exopolissacarídeos e a contagem for maior que  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, estará ocorrendo à formação de um biofilme (ZOTTOLA, 1997).

As interações que ocorrem primeiro entre as células e o substrato são aquelas forças de curta distância, envolvendo carga e hidrofobicidade, sendo que a hidrofobicidade é atribuída à membrana externa da célula bacteriana. (ZOTTOLA, 1994, 1997).

Os biofilmes são constituídos de microrganismos aderidos às superfícies, onde estão envolvidos por uma camada de matéria orgânica, ficando estes microrganismos fortemente aderidos à superfície por meio de filamentos de natureza polissacarídica, chamados de glicocálix (CRIADO et al., 1994). Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos sais minerais e vitaminas, que formarão um depósito, onde os microrganismos continuarão a crescer, formando cultivo puro ou associações com outros microorganismos (MOSTELER e BISHOP, 1993).

Na indústria de alimentos, as superfícies que entram em contato com os alimentos, como aço inoxidável, vidro, borracha, fórmica, polipropileno, polietileno e policarbonato permitem processos de adesão e formação de biofilmes (ZOTTOLA, 1997).

Os principais microrganismos alteradores que contribuem para a formação de biofilme são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp. e *Bacillus cereus* (CRIADO et al., 1994), *Enterococcus faecium* (ANDRADE et al., 1998), *Pseudomonas fluorescens* (MOSTELLER e BISHOP, 1993; ZOTTOLA, 1997). Entre os microrganismos patogênicos encontram-se: *Yersinia enterocolitica* (MOSTELLER e BISHOP, 1993; ZOTTOLA, 1994), *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila* (BAL' A et al., 1998), *B. cereus* e *E.coli* O157: H7 (BOWER et al., 1996).

A *Escherichia coli* apresenta-se na forma de bastonetes curtos, não esporulantes, Gram-negativo e possui flagelos peritríquios, podendo ocorrer tanto isolados como em pares ou formando cadeias pequenas. Fazem parte da microbiota do intestino grosso de homens e animais de sangue quente. Algumas linhagens podem formar cápsulas. São microrganismos anaeróbios facultativos ou aeróbios podem se desenvolver na faixa de temperatura de 10°C a 45°C, sendo o ótimo na faixa de 30°C a 37°C (BUCHANAN e GIBSONS, 1974 citado por CERRI, 1984; ELLEY, 1996). Algumas cepas podem ser o agente etiológico de infecções de origem alimentar e, ocasionalmente septicemia e meningite (ELLEY, 1996).

A *E. coli* juntamente com *Enterobacter aerogenes* são os principais microrganismos pertencentes ao grupo coliforme, e a sua presença em alimentos deve ser analisada sob dois aspectos: pertencem à família das Enterobacteriaceas, indicando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e existem cepas que são patogênicas ao homem, particularmente no caso de *E. coli* O157:H7 que pode causar a síndrome urêmica hemolítica (ELEY, 1996). *E. coli* pode multiplicar-se em alimentos, atingindo populações na ordem de 10<sup>5</sup> a 10<sup>7</sup> UFC/g, sendo que nestas condições pode causar infecções (ELEY,1996). Os coliformes normalmente estão acompanhados de microrganismos psicrotróficos que podem contaminar o leite após a pasteurização( BARNARD 1981, citado por CERRI, 1984).

*Bacillus sporothermodurans* é uma espécie mesofílica estritamente aeróbia, produtora de esporos que são altamente resistentes ao calor e que sobrevivem ao tratamento UAT (Ultra Alta Temperatura) do leite, podendo subsequêentemente germinar e multiplicar durante a estocagem (HERMAN et al., 1998).

Trabalhos sugerem que *B. sporothermodurans* não são patogênicos, mas sua presença em leite UAT devido à alta resistência ao calor de seus esporos, pode elevar o número de mesófilos aeróbios e torná-lo em desacordo com os padrões legais vigentes (BRASIL, 2001).

Pesquisa com 100 amostras leite UAT adquiridos em postos de venda da região de São Paulo no ano de 1999, mostrou que 45% das amostras estavam fora dos padrões estabelecidos pela Portaria SVS/MS nº451/97 – 100 UFC/mL- e que 55% das amostras analisadas após choque térmico a

115°C/7min foram positivas para presença de esporos (ZACARCHENCO et al., 2000). Dos produtos analisados, que foram processados a 150°C/3seg, por aquecimento direto, apenas 10 amostras (22,2%) foram positivas para a presença de esporos mesófilos termorresistentes.

A limpeza e sanificação de equipamentos e utensílios têm um papel importante para a indústria de alimentos no que diz respeito à prevenção e o controle da formação de biofilmes, pois a eficiência dos sanificantes é reduzida devido à reação que ocorre entre o sanificante e os resíduos de gordura, carboidratos, proteínas e minerais (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

Os biofilmes podem ser desejáveis ou indesejáveis. Desejáveis, como no caso de biorreatores para a produção de fermentados, as bactérias produtoras de ácido acético crescem, se agregam nos fragmentos de madeira e convertem os substratos em vinagre. Os microrganismos agregados são também utilizados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de águas residuárias. No entanto, biofilmes podem reduzir a eficiência do processo de cloração da água (BEER et al., 1994). Em relação aos aspectos microbiológicos, processos de adesão podem contaminar alimentos com microrganismos alteradores e/ou patogênicos, o que pode levar a sérios problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica (CRIADO, 1994).

## **2.4. Higienização nas indústrias de alimentos**

A higienização tem como objetivo garantir a qualidade final dos produtos, de preservar a saúde do consumidor, além de prevenir a formação de biofilmes. O procedimento de higienização está diretamente relacionado ao tipo de resíduo que se deseja retirar da superfície a ser higienizada (MACÊDO, 2000). Falhas neste procedimento podem levar a contaminações por microrganismos patogênicos e ou alteradores, além de contaminações provocadas por substâncias químicas e agentes físicos.

Nas indústrias de alimentos, o processo de higienização se divide em duas etapas: a limpeza e a sanificação, que são complementares. Na etapa de limpeza, o objetivo principal é a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras e

sais minerais. A sanificação tem como objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir os microrganismos alteradores das superfícies de equipamentos, utensílios, manipuladores e dos ambientes até níveis considerados seguros. A sanificação pode ser realizada tanto por sanificantes físicos, como o calor, sob a forma de vapor, água ou ar quente, e a radiação ultravioleta, quanto por sanificantes químicos, como os compostos clorados, iodados e de quaternário de amônia, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, clorhexidina, álcoois, entre outros (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Apenas limpeza não é suficiente para diminuir em níveis seguros a microbiota das superfícies. Por isso a sanificação é imprescindível. Os resíduos nas superfícies protegem os microrganismos da ação dos agentes sanificantes e reagem com os sanificantes, diminuindo sua eficiência (GIESE, 1991; MARRIOTT, 1995; TROLLER, 1993).

Uma higienização eficiente é o resultado de um conjunto de fatores, onde inclui-se a ação química, mecânica e térmica, além de tempo de contato utilizado no procedimento de higienização. Uma otimização destes fatores leva a uma maior eficiência na higienização. A equação empírica a seguir mostra a relação eficiente entre os fatores, onde HE significa higienização eficiente.

$$HE = \text{AÇÃO QUÍMICA} \times \text{AÇÃO MECÂNICA} \times \text{AÇÃO TÉRMICA} \times \text{TEMPO}$$

A ação química promove, por exemplo, as reações de saponificação e/ou emulsificação da gordura. Na saponificação, os ácidos graxos insolúveis em água reagem com os agentes alcalinos, formando o sabão que, sendo solúvel em água, é removido da superfície. A emulsificação muda a polaridade dos resíduos gordurosos e ácidos graxos tornando-os solúveis em água. Esta reação química pode ser obtida por agentes tensoativos, que apresentam em sua estrutura uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. A parte hidrofóbica interage com os resíduos de gordura enquanto que a hidrofílica apresenta afinidade pela água, o conjunto formado recebe o nome de micela.

A solubilização de proteínas ocorre quando o pH está, abaixo ou acima do ponto isoelétrico (PIE). Entretanto, a solubilização é maior em valores de pH mais elevados, onde a proteína tem carga livre negativa, mantendo-se solúvel

em água. Por isto, para a solubilização proteínas usam-se soluções alcalinas, como o hidróxido de sódio a 1%, com pH próximo de 13.

A deposição de resíduos minerais é originária dos sais presentes na água, dos alimentos e das soluções de limpeza e sanificação. Estes resíduos devem ser evitados pelo emprego de agentes complexantes ou aplicações de soluções ácidas. Por exemplo, ácido nítrico a 0,5%, com pH próximo de 2.

A ação mecânica caracteriza-se pelo contato eficiente entre os agentes de higienização com os resíduos e os microrganismos. Pode ser obtida, através do contato entre os agentes e as superfícies, como acontece em limpezas manuais, ou por meio da velocidade de circulação das soluções de higienização como ocorre no processo CIP (Cleaning in place). Neste caso, a velocidade deve ser no mínimo de 1,5 m/s.

A ação térmica aumenta à medida que aumenta a temperatura das soluções obtendo-se uma maior eficiência da higienização. Por outro lado, a temperatura máxima utilizada é limitada por outros fatores como o método de higienização e o resíduo a ser removido.

O tempo de contato entre os sanificantes e os resíduos é necessário para as reações químicas ocorrerem. Quanto maior o tempo de contato mais eficiente será a higienização.

No entanto, estas reações químicas ocorrem no processo de limpeza com mais eficiência nos minutos iniciais da aplicação dos agentes químicos (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Qualquer alteração num destes fatores, implica na alteração do outro para manter o mesmo nível de eficiência.

Para procedimentos de higienização eficientes, as indústrias de alimentos devem escolher de forma correta os agentes de limpeza e sanificação, levando em conta o tipo e o grau de resíduos aderidos às superfícies, a qualidade da água empregada, a natureza da superfícies a ser higienizada, métodos de higienização e os tipos e níveis de contaminação microbiológica.

## **2. 5. Etapas da Higienização**

### **2.5.1. Pré-lavagem**

A pré-lavagem é efetuada, com o objetivo de reduzir a quantidade de resíduos presentes nas superfícies de equipamentos e utensílios. Nesta fase, ocorre a remoção de 90% dos resíduos solúveis em água, Além disso, acontece remoção dos resíduos não solúveis em água pela ação mecânica e a diminuição da microbiota das superfícies (ANDRADE e MACÊDO, 1996). A pré-lavagem deve ser efetuada imediatamente após o uso do equipamento ou utensílio. Normalmente, usa-se temperatura em torno de 35-40°C. Temperaturas baixas solidificam os resíduos de gordura e temperaturas elevadas desnaturam resíduos de proteína, dificultando o procedimento de higienização.

### **2. 5.2. Lavagem com detergentes**

Nesta etapa, ocorre a aplicação dos agentes de limpeza, o que se faz promovendo o contato direto dos detergentes com as superfícies e as sujidades, com o objetivo de dispersá-las em água e evitar redeposição nas mesmas superfícies. Para remoção de resíduos de carboidratos, gordura e proteínas substâncias ou formulações alcalinas são usadas. Íons hidroxilas liberados pelos alcalinos, associados ao aquecimento, por exemplo, 80°C, na limpeza CIP (“Cleaning In Place”), reage com ácidos graxos, formando sabão, solúveis em água. As gorduras também podem ser removidas pela interação com agentes tensoativos. A parte apolar do tensoativo tem afinidade com a gordura e a parte polar pela água. Forma-se uma micela que é solúvel em água. As proteínas são removidas pela elevação do pH. A carga elétrica das proteínas apresenta-se negativa e, estas, por repulsão eletrostática ficam suspensas em água. As soluções de limpeza devem ser circuladas a uma velocidade mínima de 1,5 m/s.

Para as formulações, podem ser usados agentes alcalinos, como a soda cáustica e o carbonato de sódio; os fosfatos, como o fosfato trissódico e o

hexametáfosfato de sódio; os agentes complexantes , como o Na-EDTA e o gluconato de sódio e, ainda, os tensoativos, como o dodecilbenzeno sulfonato de sódio.

A remoção de resíduos minerais é efetuada por substâncias ou formulações ácidas. Por exemplo, os ácidos nítrico e fosfórico ou ácidos orgânicos, são usados em concentrações de 0,5 a 1% e quando possível a temperaturas de 70°C.

### **2. 5. 3. Enxágüe**

Depois da lavagem com o detergente, os equipamentos devem ser bem enxaguados para promover a remoção dos traços dos agentes de limpeza e do material reagido. Quando possível, a enxaguagem deve ser feita à temperatura mais elevada o que favorece a eliminação de microrganismos, além de facilitar a evaporação da água das superfícies, limitando o crescimento microbiano. Deve-se garantir a remoção completa dos agentes de limpeza. Por exemplo, para os detergentes alcalinos tomase uma amostra da água de enxágüe e adiciona-se gotas de fenolftaleína como indicador de pH. A água deve permanecer incolor, indicando pH abaixo de 8,3. Para os detergentes ácidos, pode-se avaliar a água de enxágüe, adicionando gotas de metilorange, devendo a água ficar amarela, indicação de pH acima de 4,6.

### **2. 5. 4. Sanificação**

A última etapa de procedimento de higienização, é a sanificação onde objetiva-se eliminar microrganismos patogênicos e a redução de alteradores até níveis seguros, nas superfícies de equipamentos e utensílios. A etapa de limpeza reduz a microbiota, mas não até índices satisfatórios. Entretanto, um equipamento, onde não se efetuou um procedimento de limpeza adequado, não poderá ter um procedimento de higienização eficiente, pois os resíduos ali presentes protegerão os microrganismos da ação dos sanificantes.

A sanificação efetuada de modo eficiente previne contaminações posteriores, diminuindo com isso a perda de alimentos e deve ser efetuada imediatamente antes do uso dos equipamentos e utensílios (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Para a realização do processo de sanificação pode-se utilizar sanificantes físicos, como o calor, sob a forma de vapor, água ou ar quente, e a radiação ultravioleta, ou sanificantes químicos, onde incluem-se os compostos clorados, iodados e de quaternário de amônia, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, clorhexidina, álcoois, entre outros.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa e no Laticínios da Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE/DTA/UFV).

#### **3.1. Avaliação da qualidade microbiológica da água pela técnica da bioluminescência**

##### **3.1.1. Seleção da amostras**

Foram utilizadas amostras de água de manancial, floculada, decantada e filtrada, coletadas na Estação de Tratamento de Água (ETA/ UFV). Além disso, foram utilizadas água destilada, água industrial, água gelada pasteurizada, água de resfriamento de amônia e condensado coletadas no Laticínios da Funarbe/DTA/UFV.

Foram selecionados para avaliação no teste de ATP-bioluminescência, três diferentes tipos de água, água de manancial, água de resfriamento de

amônia e água industrial, baseando-se em suas características físicas, químicas e microbiológicas.

### **3.1.2. Análises físico-químicas e microbiológicas**

As seguintes análises físico-químicas e microbiológicas foram efetuadas, conforme metodologias propostas pela APHA – American Public Health Association (GREENBERG, et al.,1992):

- a) dureza, expressa em mg/L de  $\text{CaCO}_3$ ;
- b) alcalinidade total, expressa em mg/L de  $\text{CaCO}_3$ ;
- c) acidez, expressa em mg/L de  $\text{CO}_2$ ;
- d) cloretos, expressos em mg/L de NaCl;
- e) turbidez, expressa em UNT;
- f) pH;
- g) mesófilos aeróbios, expressa em UFC/mL;
- h) coliformes totais, expressos em NMP/100 mL

### **3.1.3. Técnica da bioluminescência para análise de água**

As amostras de água de manancial, resfriamento de amônia e industrial previamente selecionadas (item 3.1) foram submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas (item 3.1.2) e também pela técnica de ATP-bioluminescência, usando-se kit AQUATEST TOTAL (BIOTRACE, 2000), para determinação do ATP livre mais o microbiano e kit AQUATEST FREE, para determinação, do ATP livre, ou seja, de origem não microbiano. Esta técnica consistiu em coletar aproximadamente 50 mL de uma amostra de água em béquer esterilizado de onde foi retirada uma alíquota com cerca de 0,1 mL com o auxílio dos kits. O kit foi introduzido na cubeta que contém o complexo enzimático luciferina/luciferase, e através de agitação manual por aproximadamente 20 segundos, promoveu-se a reação de formação de luz.

Após agitação, a cubeta foi inserida em local apropriado no luminômetro, obtendo-se a leitura em 10 segundos, devidamente impressa. O resultado foi expresso em unidades relativas de luz (URL).

A concentração do ATP microbiano foi determinada pela diferença entre as concentrações de ATP total e livre.

### **3.2. Adesão microbiana em superfícies usando a técnica de ATP bioluminescência e contagem padrão em placas.**

#### **3.2.1. Microrganismos avaliados**

Foram utilizados o *Bacillus sporothermodurans* CCT6247, obtido do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT) - EPAMIG, Juiz de Fora, MG e a *Escherichia coli* K12, cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Culturas estoque foram mantidas em ágar BHI (Broth Heart Infusion) (Merck), acrescido de 0,5 g/L de citrato férrico amoniacal e 1 g/L de esculina.

#### **3.2.2. Suspensão de esporos de *Bacillus sporothermodurans***

A partir da cultura estoque, após descongelamento à temperatura ambiente (20 - 25°C), o microrganismo foi ativado em ágar BHI, contido na posição inclinada em tubo de ensaio com tampa rosqueável, acrescido de 0,5 g/L de citrato férrico amoniacal e 1 g/L de esculina.

A ativação foi efetuada por meio de três repicagens consecutivas pela técnica de estriamento em ágar BHI acrescido de 1% de esculina (REAGEN) e 0,5% citrato férrico amoniacal, solidificado na posição inclinada, em tubo de ensaio 15 X160 mm, sendo incubado a 37°C por 48 horas. Em seguida, 1mL de solução tampão fosfato, 0,31M em pH 7,0±0,1, (ICSMF, 1978) foi adicionado nestes tubos e agitados manualmente para obtenção de uma suspensão de células vegetativas. A partir desta suspensão foram retiradas alíquotas de 1 mL que foram inoculadas na superfície de 250mL de um meio de esporulação, com a seguinte composição: 3,0g extrato de carne, 5,0g triptona, 1,0g amido, 10 mg sulfato de manganês, 20,0g ágar em 1000 mL de água destilada e pH final entre 6,9 e 7,1. O meio foi distribuído em quatro garrafas de Roux de 800 mL.

A formação de esporos foi acompanhada mediante observação ao microscópio de contraste de fase (Olympus BX 40) até obter-se cerca de 90-95% de esporulação. A incubação prolongou-se por cerca de 9 dias a 37°C para se obter a esporulação desejada.

Após o período de incubação, os esporos foram removidos do meio de esporulação, usando-se aproximadamente 20 mL de água destilada esterilizada e coletados em tubos de centrifugação JÁ-20 (BECKMAN, modelo J2- MC). A centrifugação foi realizada a 3000g (5000 rpm) por 10 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos com os esporos ressuspensos em água destilada esterilizada para nova centrifugação. Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final, os esporos de cada tubo de centrifuga foram suspensos em glicerol e tampão fosfato 0,31 M em pH 7,0±0,1 (15:85) e acondicionados em volumes de 1mL em tubos de Eppendorf (AKUTSU, 2001). O número de esporos no lote, que se encontrava em torno de  $7,3 \times 10^7$  esporos /mL foi confirmado, por meio de contagem em placa, pela técnica de espalhamento superficial com alça de Drigalsky, em ágar BHI e incubação a 37°C por 24 horas. Os tubos de Eppendorf foram armazenados a -18°C até o momento do uso.

### **3.2.3. Suspensão de *Escherichia coli* K12**

A cultura pura deste microrganismo foi mantida sob refrigeração à temperatura de 4°C, em tubos de ensaio, contendo 5 mL de meio semi-sólido BHI.

Após três repiques sucessivos em caldo BHI, para ativação da cultura de *Escherichia coli* a 35°C por 24 horas, foram inoculados volumes de 1mL na superfície de 250 mL de meio ÁGAR-BHI contidos em quatro garrafas de Roux. As células foram removidas do meio, usando em torno de 20 mL de água destilada esterilizada e coletados em tubos de centrifugação JÁ-20 (BECKMAN, modelo J2- MC). A centrifugação foi realizada a 3000g (5000 rpm) por 10 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos com as células ressuspensas em água destilada esterilizada para nova centrifugação. Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final,

as células vegetativas foram utilizadas imediatamente (SILVA, 2000). A confirmação do número de células vegetativas no lote que se encontrava em torno de  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL foi feita por meio de contagem em placa pela técnica de profundidade em ágar e incubação a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

#### **3.2.4. Adesão de *Bacillus sporothermodurans* nos cilindros de aço inoxidável**

Para o preparo da suspensão, os esporos contidos no tubo de Eppendorf armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  foram descongelados e em seguida diluídos em 99 mL solução tampão fosfato, 0,31 M em pH  $7,0 \pm 0,1$ , esterilizada. Realizou-se contagem em placa, pela técnica de espalhamento superficial, do número de esporos nesta suspensão antes da adesão nos cilindros de aço inoxidável. As diluições decimais foram agitadas no Vortex por um minuto. Alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em ágar BHI, solidificado na placa de Petri, e espalhadas, com alça de Drigalsky devidamente flambada com álcool, até que fossem totalmente absorvidas no meio solidificado. As placas foram incubadas invertidas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Para a adesão foi utilizado um béquer com capacidade para 100 mL, contendo 5 cilindros de aço inoxidável (AISI 304, com 10 mm de comprimento, 10 mm de diâmetro externo, 9 mm de diâmetro interno e polimento 4) devidamente esterilizados a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, imersos em 20 mL da suspensão de esporos e incubados a  $37^{\circ}\text{C}/24$  horas. Após as 24 horas, foram retirados os cinco cilindros e estes colocados por um minuto em placas de petri, contendo aproximadamente 25 mL de água destilada esterilizada, com o objetivo de remover esporos que não aderiram aos cilindros. Em seguida, os cilindros foram colocados para secagem, à temperatura ambiente ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ) em papel de filtro contido em placas de Petri por 20 minutos. Após secos, cada cilindro foi colocado em um tubo de ensaio, contendo 2 mL de solução tampão fosfato, agitado por um minuto no Vortex e após diluições adequadas, alíquotas de 0,1 mL e 1,0 mL da solução tampão foram espalhadas na superfície de ágar BHI (OLIVEIRA, 2001). Após as incubações a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, os esporos foram contados, expressando-se os resultados em UFC/cm<sup>2</sup>.

### **3.2.5. Adesão de esporos *Bacillus sporothermodurans* em polietileno**

As superfícies internas das embalagens de polietileno de baixa densidade foram previamente sanificadas com álcool 70° GL.

Nesta etapa, empregaram-se embalagens de polietileno de baixa densidade com espessura de 0,07 cm e área interna de 294 cm<sup>2</sup> (14,0 X 21 cm), apresentando capacidade para 100 mL de líquido, cedidas pelo Laticínios da Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE). A estas embalagens foram adicionados 100 mL da suspensão de esporos. Em seguida à adição das suspensões, as embalagens foram seladas termicamente (Seladora TecnoB modelo S300) e incubadas em BOD modelo 50A14 a temperatura de 37°C por 24 horas, para permitir a adesão bacteriana. Após o tempo de incubação, as embalagens passaram pelos procedimentos: o tampão utilizado na inoculação da embalagem foi escoado e a esta embalagem foram adicionados 100 mL de tampão fosfato esterilizado, pH 7,0 ± 0,1 a embalagem ficou em repouso por 1 minuto para a retirada dos esporos que não aderiram à superfície do polietileno. Depois de escoado o tampão, a embalagem foi rinsada, com a agitação manual vigorosa durante 90 segundos, com 100 mL de tampão fosfato esterilizado.

Após a rinsagem, os tampões foram diluídos conforme necessário e alíquotas destas diluições foram plaqueadas, pela técnica de espalhamento superficial em ágar BHI. As placas de Petri foram incubadas invertidas à temperatura de 37°C por 24 horas para a determinação do número de esporos aderidos à embalagem (SILVA, 2000). Os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

### **3.2.6. Adesão de *Escherichia coli* K12 em aço inoxidável**

Foi utilizado o mesmo procedimento do item 3.2.4 excetuando-se o microrganismo, a *E.coli* K12 o meio de cultura, o PCA, a temperatura de incubação de 35°C e a técnica de inoculação por profundidade. Para este

microrganismo, a adesão foi efetuada com células centrifugadas e também com células não centrifugadas suspensas em BHI.

### **3.2.7. Técnica de ATP-bioluminescência para os microrganismos aderidos em aço inoxidável e polietileno**

Após os procedimentos de adesão de *Bacillus sporothermodurans* em aço inoxidável e em polietileno de baixa densidade e a adesão de *Escherichia coli* K12 em aço inoxidável, as suspensões foram avaliadas pela técnica de ATP Bioluminescência, que consistiu em retirar alíquotas destas suspensões com o auxílio do Kit AQUATEST Total (BIOTRACE). Para as suspensões de *E. coli*, oriundas da adesão com células não centrifugadas, foi utilizado também o kit AQUATEST Free (BIOTRACE). O kit foi introduzido na cubeta que continha o complexo enzimático luciferina/luciferase e através de agitação manual por aproximadamente 20 segundos, promoveu-se à reação de formação de luz.

Após agitação a cubeta foi inserida em local apropriado no luminômetro, obtendo-se a leitura em 10 segundos, devidamente registrada em papel acoplado no aparelho. O resultado foi expresso em unidades relativas de luz (URL).

### **3.3. Avaliação do procedimento de higienização em linha de pasteurização de leite, usando técnica da bioluminescência e contagem Padrão em Placas**

Nesta etapa, foram avaliados 6 equipamentos da linha de pasteurização de leite: caminhão tanque (CAT), tanque de resfriamento de leite cru (TRC), tanque de equilíbrio (TEP), desnatadeira (DES), tanque de armazenamento de leite pasteurizado (TLP) e tanque de equilíbrio para empacotamento de leite pasteurizado (TEL). Estes equipamentos foram avaliados antes e após o procedimento de higienização pela técnica de swab (APHA, 1992) e pela técnica de ATP-bioluminescência, (BIOTRACE, 2000).

O swab utilizado foi de algodão com 0,5 cm de diâmetro por 2,0 cm de comprimento em uma haste de 12 cm de comprimento, esterilizados a 121° C por 15 minutos. Para a remoção dos microrganismos das superfícies, o swab

foi umedecido em 10 mL de solução neutralizante de tiosulfato de sódio 0,25%, devidamente esterilizada a 121°C por 15 minutos, contida em tubo de ensaio. O excesso foi removido, pressionando-se o swab na parede interna do tubo de ensaio e este foi friccionado, formando um ângulo de 30° com a superfície, por duas vezes no sentido de vai-e-vem em duas diagonais, numa área de 100 cm<sup>2</sup> (10 x10 cm) (Figuras 2 e 3).

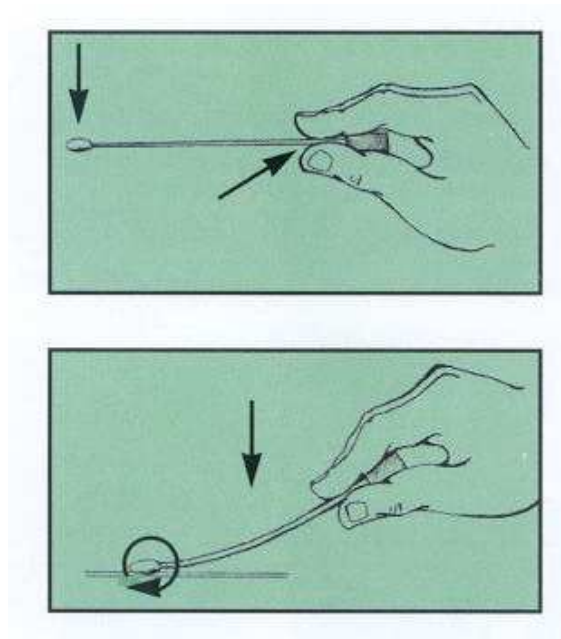


Figura 2 - Técnica adequada para remoção de ATP na superfície de equipamentos e utensílios, mostrando a forma de segurar o swab, o ângulo e movimento circular do swab.

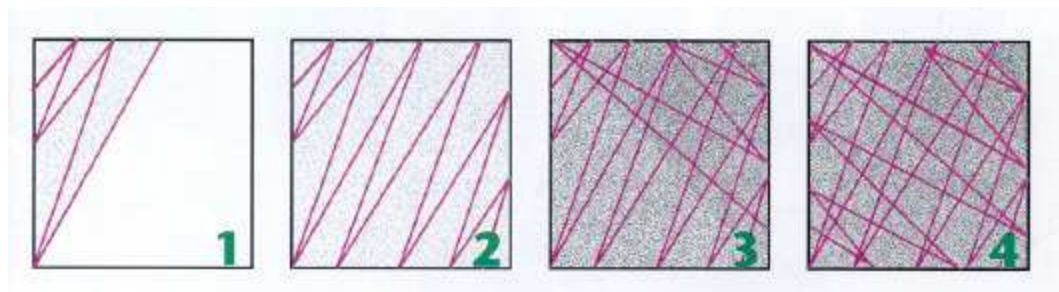


Figura 3 - Técnica adequada para remoção de ATP da superfície de equipamentos e utensílios, mostrando a área e a forma em diagonal para a coleta.

Em seguida, o swab foi colocado no tubo de ensaio contendo a solução neutralizante e transportado para o laboratório sob refrigeração para as análises de mesófilos aeróbios. Após diluições adequadas, alíquotas de 0,1 e 1,0 mL da solução foram plaqueadas por profundidade em PCA e placas incubadas invertidas a 35°C por 48 horas. Os resultados foram expressos em  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Para a avaliação das superfícies pela técnica de ATP-bioluminescência, o procedimento para a coleta das amostras foi com o Kit Clean Test (BIOTRACE, 2000). Após a coleta na superfície, como descrito anteriormente, o swab foi colocado na cubeta entrando em contato com os reagentes. A agitação era realizada manualmente em forma circular por 20 segundos. O kit foi inserido em local apropriado no luminômetro, obtendo-se leitura em cerca de 10 segundos, devidamente registrada. Os resultados foram expressos em  $\log_{10}$  URL.

A superfície pode ser considerada limpa quando apresenta resultados de até 150 URL ( $\leq 150$  URL), sendo suspeita no intervalo de 151 a 300 URL e como suja acima de 300 URL ( $> 301$  URL), quando avaliada pelo equipamento BiotraceXcel (BIOTRACE, 2000).

### 3. 4. Avaliação dos resultados

### **3.4.1. Avaliação da qualidade microbiológica da água**

Para a avaliação da qualidade microbiológica da água, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e três tratamentos.

A partir das análises do  $\log_{10}$  de URL e UFC/cm<sup>2</sup> de variância, foram comparadas as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### **3.4.2. Avaliação do processo de adesão em superfícies**

Foi avaliado por análise descritiva dos  $\log_{10}$  de UFC (unidades formadoras de colônias) e  $\log_{10}$  de URL (Unidades Relativas de Luz), para as diferentes superfícies.

### **3.4.3. Avaliação do procedimento de higienização em linha de pasteurização de leite**

Para a avaliação do procedimento de higienização em linha de pasteurização de leite, experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições.

Os resultados foram avaliados pela análise de variância seguida pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Seleção de amostras de água de tratamento convencional e de uso em laticínios para o teste de ATP-bioluminescência**

Os Quadros 3 e 4 apresentam os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas de amostras de água coletadas no sistema de tratamento de água (ETA/UFV) e de amostras de água de uso no Laticínios/FUNARBE/DTA/UFV. Constata-se que houve variações nas análises efetuadas em função da amostra coletada. Por exemplo, a turbidez variou entre

0,57 UNT na amostra de água destilada até 91,48 UNT na amostra de água do floclador. O pH variou de 6,96 até 8,60 para as águas industrial e resfriamento de amônia, respectivamente.

Em relação à acidez, expressa em mg/L de CO<sub>2</sub>, observou-se à ocorrência de amostras, com ausência de acidez até 10,39 mg/L de acidez, como no caso da água de resfriamento e da água do floclador. Para a alcalinidade, expressa em CaCO<sub>3</sub>, as amostras variaram de 22,49 mg/L de alcalinidade, para água destilada até 231,67 mg/L de alcalinidade para água de resfriamento. No que se refere aos cloretos, expresso em mg/L de NaCl a amostra que apresentou menor concentração foi água destilada com 9,43 mg/L e a de maior concentração foi à água de resfriamento de amônia, com 140,26 mg/L.

Em relação à dureza, expressa em mg/L de CaCO<sub>3</sub>, a variação foi de 18,00 até 183,00 para as amostras de água destilada e de resfriamento de amônia, respectivamente. Esta última, recebe um tratamento físico-químico e microbiológico.

Quadro 3 - Análises físico-químicas de águas originárias do tratamento convencional da ETAUFV e de uso em indústria de Laticínios. Média de três repetições.

Análises Físico-químicas						
Amostras	Turbidez* (UT)	pH	Acidez** (mg/L)	Alcalinidade*** (mg/L)	Cloretos**** (mg/L)	Dureza*** (mg/L)
Água destilada	0,57	7,10	3,30	22,49	9,43	18,00
Água Gelada Pasteurizada	4,35	7,06	7,97	50,46	16,21	43,17
Água industrial	1,02	6,96	7,57	33,28	14,56	41,33
Água de vapor condensado	3,79	7,17	7,81	23,77	13,37	20,00
Água de resfriamento de amônia	18,58	8,60	0,00	231,67	140,26	183,00
Água de municipal	46,6	7,09	7,81	42,87	11,90	36,33

manancial						
Água de floculador	91,48	7,01	10,39	42,97	13,92	42,17
Água decantador	12,35	7,08	8,78	46,26	14,92	40,67
Água filtrada	0,54	7,02	7,08	42,05	17,67	39,00

\* Unidade de turbidez

\*\* expressa em CO<sub>2</sub>

\*\*\* expressa em CaCO<sub>3</sub>

\*\*\*\* expressos em NaCl

Quadro 4 - Análises microbiológicas de águas originárias do tratamento convencional da ETA/UFV e de uso em indústria de Laticínios. Média de três repetições.

Amostras	Análises Microbiológicas	
	Mesófilos Aeróbios (UFC/mL)	Coliformes Totais (NMP/100mL)
Água Destilada	1,70X10 <sup>3</sup>	< 2
Água Gelada Pasteurizada	1,50X10 <sup>2</sup>	6
Água Industrial	2,70X10 <sup>0</sup>	< 2
Água de Vapor Condensado	3,40X10 <sup>1</sup>	< 2
Água de Resfriamento de Amônia	2,50X10 <sup>3</sup>	90
Água de Manancial	6,50X10 <sup>2</sup>	400
Água de Floculador	1,20X10 <sup>2</sup>	1071
Água Decantador	4,40X10 <sup>3</sup>	110
Água Filtrada	1,50X10 <sup>2</sup>	7

Para as análises microbiológicas, constataram-se variações para as diversas amostras de água. Para mesófilos aeróbios, as contagens situaram entre  $2,70 \times 10^0$  UFC/mL e  $4,40 \times 10^3$  UFC/mL, para as águas industrial e de decantador. Os coliformes totais, expressos em NMP/100mL variaram de uma população menor que 2 a  $1,07 \times 10^3$ , para as amostras de água industrial e água de decantador, respectivamente.

Os resultados das análises para as amostras de água de manancial podem ser comparados àqueles da Resolução nº 20 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) do MS (Ministério da Saúde) de 1986 (Brasil, 1986). Pode-se afirmar que os parâmetros avaliados encontram-se dentro da legislação vigente.

Da mesma forma, pode-se comparar os resultados das análises da água industrial já tratada da ETA/UFV, com a Portaria nº1469 do MS, de 29 de dezembro de 2000 (BRASIL, 2001) que trata da qualidade de água potável. Neste experimento, adotou-se como especificação microbiológica para mesófilos aeróbios o número de  $5,0 \times 10^2$  UFC/mL. Este valor para mesófilos aeróbios era um padrão de legislação, de acordo com a Portaria nº36 do MS (BRASIL, 1990) não sendo mencionado na nova portaria.

Constata-se que a água industrial encontra-se dentro do padrão legal vigente e da especificação sugerida, para os parâmetros avaliados: coliformes totais e mesófilos aeróbios.

No entanto, deve-se salientar que há exigência da análise de cerca de 90 parâmetros diferentes para determinar se um manancial encontra-se em condições de potabilização (Resolução nº20) ou se a água é potável (Portaria nº1469).

Após a avaliação do conjunto de características físico-químicas e microbiológicas das diversas amostras, decidiu-se pelo uso da água de manancial, da água de resfriamento de amônia e da água industrial para realização dos testes com a técnica da bioluminescência.

Esta opção se fundamentou no fato de que se procurou selecionar amostras que apresentassem diferenças bem caracterizadas em seus aspectos físicos, químicos e/ou microbiológicos. A água de manancial apresentou

elevados valores de turbidez e de contagens de mesófilos aeróbios e de coliformes totais. Já na água de resfriamento de amônia observaram-se concentrações elevadas para todos os parâmetros avaliados. A água industrial pode ser considerada como amostra controle em função de suas boas características físico-químicas e microbiológicas.

#### 4.2. Análise da qualidade microbiológica da água pelas técnicas de bioluminescência e contagem de mesófilos e coliformes totais.

O Quadro 5 apresenta os resultados das análises físico-químicas para amostras de água do manancial, de resfriamento de amônia e industrial diferentes daquelas apresentadas no Quadro 3. Constata-se também nestas amostras, de forma semelhante as análises do Quadro 3, as diferenças nas características avaliadas para as diferentes amostras.

Quadro 5 - Análises físico-químicas das águas selecionadas para a avaliação da técnica de bioluminescência. Média de três repetições.

Amostras de Água	Análises Físico-químicas					
	Turbidez * (UT)	pH	Acidez** (mg/L)	Alcalinidade*** (mg/L)	Cloretos**** (mg/L)	Dureza** * (mg/L)
Manancial	10,86	6,95	7,24	54,49	11,90	51,56
Resfriamento de amônia	5,86	8,54	0,00	278,63	163,76	251,78
Industrial	0,98	6,74	7,41	56,55	15,26	54,67

\* Unidade de turbidez

\*\* expressa em CO<sub>2</sub>

\*\*\* expressa em CaCO<sub>3</sub>

\*\*\*\* expressos em NaCl

A análise de variância mostra que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a quantidade de ATP total, livre, e microbiano e também nas contagens

de mesófilos aeróbios e de coliformes totais para as amostras de água avaliadas (Quadro 6).

Quadro 6 - Resumo das análises de variância dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) da concentração de Unidades Relativas de Luz (URL) ATP total, livre e microbiano, de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de mesófilos por mL e de Número Mais Provável (NMP) de coliformes por 100 mL de amostras de água de manancial, resfriamento de amônia e industrial.

FV	GL	Quadrado Médio				
		ATP total	ATP livre	ATP microbiano	Mesófilos aeróbios	Coliformes totais
Tratamento	2	0,404**	0,194*	1,177**	14,68**	5,993**
Resíduo	6	0,030	0,028	0,105	0,053	0,124

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Verifica-se pelo Quadro 7 que as amostras de água de manancial e de resfriamento de amônia não apresentaram diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ), pelo teste de Tukey, para as quantidades de ATP total, livre e também para as contagens microbianas. Verificou-se, ainda, como esperado, que a amostra de água industrial foi aquela que apresentou a menor concentração dos diferentes tipos de ATP avaliados e também as menores contagens microbianas.

Em relação à água industrial, houve a concordância entre os métodos de bioluminescência e de contagem de mesófilos aeróbios e coliformes totais. Para a técnica da bioluminescência, o fabricante (BIOTRACE, 2000) recomenda valores menores que 150 URL, que corresponde ao  $\log_{10}$  de 2,18, para que a água seja considerada em condições higiênicas satisfatórias. Independente da origem do ATP, os valores encontrados para a água industrial, encontram-se abaixo do recomendado. No entanto, deve-se ressaltar que esta técnica não diferencia as espécies microbianas contaminantes. Os resultados das análises microbiológicas de mesófilos aeróbios e coliformes totais estão dentro dos padrões legais vigentes (BRASIL, 1990, 2001).

Quadro 7 - Média da concentração dos Logaritmos decimais ( $\text{Log}_{10}$ ) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total, livre e

microbiano, de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL e de Números Mais Prováveis (NMP) por 100 mL de amostras de água de manancial, resfriamento de amônia e industrial. Média de três repetições.

Amostras de Água	ATP total (URL)	ATP microbiano (URL)	ATP livre (URL)	UFC/mL	NMP/100 mL
Resfriamento de amônia	2,47 <sup>a</sup>	1,92 <sup>a b</sup>	2,31 <sup>a</sup>	4,23 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>
Industrial	1,97 <sup>b</sup>	1,22 <sup>b</sup>	1,86 <sup>b</sup>	0,33 <sup>b</sup>	0,30 <sup>b</sup>
Manancial	2,69 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>	2,28 <sup>a</sup>	4,09 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>

\* Médias, com mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

No que se refere à água do manancial, observa-se que as concentrações de ATP total e livre encontram-se acima daquelas obtidas para a água industrial. As características microbiológicas, de turbidez e cor diferenciam estas amostras. Comparando as três amostras avaliadas, as concentrações de ATP total e microbiano foram as mais elevadas para a água de manancial e foram consistentes com os resultados das contagens de mesófilos aeróbios e coliformes totais. Os resultados das análises pela técnica de ATP-bioluminescência sugere que a água do manancial encontra-se em condições insatisfatórias, acima de 300 URL para ATP total, e em condições de alerta entre 150 e 300 URL, para ATP livre e microbiano. Assim, os resultados sugerem que a determinação do ATP total é o recomendado para avaliar a qualidade microbiológica da água de manancial. Neste caso, não é um problema considerável o fato da técnica não diferenciar espécies microbianas, já que a água receberá tratamentos, como sedimentação com coagulantes, floculação, filtração e cloração, para o controle da turbidez e o controle microbiológico.

Apesar da concentração relativamente elevada de coliformes totais, os valores encontrados estão dentro dos padrões legais exigidos para água a ser potabilizada (BRASIL, 1986).

A água de resfriamento de amônia foi selecionada em função das consideráveis diferenças em suas características físico-químicas e microbiológicas. Esta água foi considerada em situação de alerta para a determinação de ATP total e livre e em boas condições de higiene para determinação do ATP microbiano. Também, neste caso os resultados indicam que teste de ATP total é mais recomendado. Talvez a qualidade físico-química da água tenha influenciado a determinação da bioluminescência, diminuindo a formação de luz. Esta água apresentou valores elevados de turbidez, pH, alcalinidade, cloretos e dureza. Pesquisas mostram que diversas substâncias detergentes e sanificantes afetam a técnica da bioluminescência. GREEN, et al. (1998), trabalhando com seis sanificantes químicos e três fontes de ATP, para avaliar o seu efeito na reação de bioluminescência encontraram que o ácido láctico e o fosfato trissódico reduziram significativamente as leituras de bioluminescência para as três fontes testadas. O hipoclorito de sódio e a amônia quaternária não tiveram efeito significativo sobre a medida de bioluminescência. O peróxido de hidrogênio a 0,1% não apresentou redução significativa nas leituras de URL, mas a 1% reduziu em 40% as medidas de bioluminescência de todas as fontes de ATP. O sanificante triclosan a 0,25% não apresentou redução significativa na leitura de bioluminescência para nenhuma das fontes. Entretanto, em concentrações de 0,5% e 1% afetou significativamente.

As informações acima mencionadas sugerem que esses sanificantes causam reduções nas medidas de ATP quando entram em contato direto com os reagentes da bioluminescência, podendo levar a uma falsa conclusão de que os equipamentos de processamento estão corretamente sanificados, quando na verdade o sanificante pode ter reduzido a leitura de URL.

Resultado semelhante foi obtido por VELAZQUEZ e FEIRTAG (1997) que avaliaram o efeito do hipoclorito de sódio e de um composto quaternário de amônia sobre uma suspensão de  $10^8$  UFC/mL de *Escherichia coli* O157:H7. Observaram que os resíduos da concentração de 100 mg/L de CRL (Cloro Residual Livre) aumentaram ligeiramente a medida de URL e não detectaram diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre os resíduos da concentração de 500 e 1000 mg/L de CRL com o controle. Os resíduos das concentrações de 10000 e 50000 mg/L de CRL diminuíram a leitura de ATP bioluminescência. Os

resíduos das baixas concentrações 100,500 e 1000 mg/L de CRT (Cloro Residual Total) não diminuíram a medida de ATP não foram efetivos contra *E. coli* O157:H7, e se esses microrganismos estivessem presentes nas superfícies, seriam detectados pela técnica, de ATP-bioluminescência exigindo para isso um novo procedimento de higienização. O composto quaternário de amônia provocou um aumento de 10% na avaliação de URL nas concentrações avaliadas, sendo efetivo contra a *E. coli* somente a 800 mg/L o que não constitui um risco, pois a superfície seria considerada suja, necessitando, portanto de um processo de higienização mais rigoroso.

#### 4.3. Avaliação de adesão microbiana em superfície de aço inoxidável e polietileno pela técnica de bioluminescência.

O Quadro 8 mostra a relação entre as avaliações de processo de adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* pelos processos de contagem em placas e a técnica de bioluminescência, em superfícies de aço inoxidável e de polietileno de baixa densidade (PEBD).

Quadro 8 - Logaritmo decimal ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total e UFC/mL em superfícies de aço inoxidável e polietileno aderidos com esporos de *Bacillus sporothermodurans*.

Superfície	UFC/mL na suspensão	UFC/cm <sup>2</sup>	$\log_{10}$ UFC/cm <sup>2</sup>	URL	$\log_{10}$ URL
Aço inoxidável	1,0X10 <sup>4</sup>	3,57X10 <sup>2</sup>	2,55	71	1,85
	1,0X10 <sup>6</sup>	2,42X10 <sup>4</sup>	4,38	119	2,08
Polietileno	1,0X10 <sup>4</sup>	1,74X10 <sup>3</sup>	3,24	76	1,88
	1,0X10 <sup>6</sup>	9,87X10 <sup>4</sup>	4,99	88	1,94

Constata-se que de acordo com a técnica da bioluminescência pode-se considerar que as superfícies estão em condições higiênicas satisfatórias. Todos os resultados encontram-se abaixo de 150 URL ( $\log_{10} < 2,18$ ). Por outro lado, avaliadas pela contagem padrão em placas as superfícies são classificadas como inadequadas para processamento de alimentos. Para o aço inoxidável, os logaritmos das contagens de esporos situaram entre 4,38 e 2,55 quando a adesão foi provocada utilizando-se suspensões de esporos cujos logaritmos da população (UFC/mL) eram de 6 e 4, respectivamente. Para o PEBD, nas mesmas condições de número nas suspensões os valores foram de 4,99 e 3,24, respectivamente. Considerando que APHA (1992) sugere que uma superfície está higienizada se apresentar até 2 UFC/cm<sup>2</sup> ( $\log_{10}$  de 0,3) e que outras instituições como a OMS e OPAS sugerem até  $5,0 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup> ( $\log_{10}$  de 1,7). Assim, os resultados indicam superfícies inadequadas para processamento de alimentos.

Nas condições deste experimento, a técnica da bioluminescência não é apropriada para avaliar a presença de esporos de *B. sporothermodurans* em ambas superfícies. Estes resultados são compatíveis com várias pesquisas disponíveis na literatura. Uma delas que avaliou sistemas de bioluminescência, trabalhou com culturas puras de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus casei* para a avaliação destes sistemas. Verificou-se que usando concentrações crescentes das culturas não houve correlação entre o aumento de UFC/mL e URL (ODEBRECHT et al., 2000).

Uma provável explicação para os resultados encontrados neste experimento seria que os esporos bacterianos não apresentam metabolismo, níveis de ATP ou transporte de elétrons detectáveis, não tendo energia suficiente para realizar a formação de luz. Assim, quando expostos ao complexo enzimático luciferina/luciferase produziram menos bioluminescência quando comparados às células vegetativas (BAKER et al., 1992).

Em relação à quantidade de esporos aderidos, constata-se que ocorreu maior adesão em polietileno comparado ao aço inoxidável. A adesão microbiana em superfícies está associada a diversos fatores, que interrelacionados determinam a quantidade de microrganismos aderidos

(ZOTTOLA, 1997). Dentre eles, incluem-se a carga elétrica e a hidrofobicidade, que poderiam estar influenciando esta maior adesão de PEBD. Também, os processos de adesão podem ter influenciado na quantidade de esporos aderidos: os cupons de aço inoxidável eram imersos na suspensão de esporos e para o PEBD o processo era o inverso. Neste caso, a suspensão era adicionada à embalagem de PEBD.

Os resultados demonstram que os esporos de *B. sporothermodurans* têm a capacidade de aderir às superfícies avaliadas e esta adesão é afetada pelo número inicial de esporos na suspensão. Para o aço inoxidável, a adesão foi de 2,42% e 3,57% para os logaritmos dos números iniciais na suspensão de esporos de 4 e 6, e para o PEBD os valores foram de 9,9% e 17,4%, respectivamente. O número de esporos aderidos aumentou com o aumento da sua concentração na suspensão. Uma outra pesquisa usando o mesmo esporo e superfície, nos tempos de adesão de 12 horas e temperatura de 37°C, mostrou porcentagens de adesão de 0,88 %, quando o  $\log_{10}$  do número de esporos na suspensão era de 4,61 e 4,66% para  $\log_{10}$  do número inicial de esporos igual 5,56 (CABRAL, 2001). A diferença entre as pesquisas, em relação ao número de esporos aderidos, deve-se, provavelmente aos diferentes tempos de adesão, de 12 e 24 horas, e às temperaturas de adesão, 18 e 37°C, usadas nos experimentos.

Pesquisa com cupons de aço inoxidável em formatos de cotovelo 90°, cilíndrico e T incubados com uma suspensão de aproximadamente  $10^5$  esporos/mL mostrou que os esporos de *B. sporothermodurans* possuem capacidade de se aderirem ao aço inoxidável. O  $\log_{10}$  do número de esporos que permaneceram aderidos por  $\text{cm}^2$  foram, respectivamente 4,01, 3,88 e 4,03 (AKUTSU, 2001). E seus valores em porcentagem correspondentes foram 3,93, 2,55 e 4,46%. O Quadro 9 mostra que a determinação das URL é afetada pelas condições de adesão da *E. coli*. Assim, constatou-se que a suspensão microbiana centrifugada associada ao tempo de repicagem do microrganismo interferiu na avaliação pela técnica da bioluminescência e também na quantidade de células aderidas. Determinaram-se valores de 113 URL para ATP total e  $5,9 \times 10^2$  UFC/ $\text{cm}^2$  de células aderidas ao aço inoxidável, quando a suspensão foi centrifugada e o tempo de 24 horas de repicagem. Sem a

centrifugação e com 12 horas de repicagem, os valores foram de 2397 URL e  $1,05 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Quadro 9 - Logaritmo decimal ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total, livre e microbiano e UFC/cm<sup>2</sup> presente em superfícies de aço inoxidável aderidos com suspensão de *Escherichia coli* K12.

Condições de adesão	Tipo de ATP	UFC/cm <sup>2</sup>	$\log_{10}$	URL	$\log_{10}$
Centrifugada, intervalo de repicagem 24 horas, tempo de adesão de 24 horas.	<b>Total</b>	$5,92 \times 10^2$	2,77	113	2,05
	<b>Livre</b>	-	-	892	2,95
Não centrifugada, intervalo de repicagem de 12 horas, tempo de adesão de 24 horas.	Total	$1,05 \times 10^4$	4,02	2397	3,38
	Microbiano	-	-	1500	3,18

- não determinado

A literatura subsidia possíveis explicações para este resultado. CROMBRUGGE e WAES (1991a) mostraram que ocorre uma diminuição na quantidade de ATP durante o crescimento celular, havendo baixo conteúdo na fase estacionária, em relação às outras etapas. Mudanças na taxa metabólica afetarão o nível de ATP, e, conseqüentemente, situações subótimas e de estresse podem alterar o conteúdo de ATP. Além disso, as diferentes formas de extração incluindo a filtração, e também a centrifugação que são utilizadas levam a situação de estresse e conseqüentemente a queda de ATP. Neste experimento é provável que com repicagem de 12 horas as células que entraram em contato com a superfície estavam na fase logarítmica no início do processo de adesão. Este fato, associado com a presença de nutrientes, aumenta o número de células na superfície após 24 horas, que pode ser observado pelos resultados do ATP microbiano—1500 URL.

Neste caso, a quantidade de ATP microbiano foi cerca de 13 vezes maior que o ATP total para células centrifugadas e com repicagens de 24 horas (Quadro 9). Também, deve-se mencionar que na suspensão não centrifugada a quantidade de ATP não microbiano, em função da presença do meio de cultura, com certeza, é maior, afetando a quantidade de ATP total.

**Nesta pesquisa, os resultados mostraram que para as células centrifugadas, a quantidade de ATP total determinada pela técnica da bioluminescência –113 URL– sugere que a superfície está em condições higiênicas adequadas. Já a técnica de contagem em placas revela condições higiênicas insatisfatórias –  $\log_{10}$  do número de células aderidas por  $\text{cm}^2$  igual a 2,77. Para as células não centrifugadas, os métodos apresentam respostas semelhantes para o ATP total. Ambos sugerem que a superfície está em condições higiênicas insatisfatórias: 2400 URL e  $\log_{10}$  do número de células aderidas por  $\text{cm}^2$  igual a 4,02. Conclui-se, assim, que a interpretação dos resultados da técnica da bioluminescência para avaliar a adesão microbiana tem que considerar dentre outros fatores as diferentes condições experimentais e a população microbiana.**

A maior adesão para as células não centrifugadas, provavelmente, deve-se ao fato de que nutrientes do meio de cultura auxiliam o processo de adesão e facilitam o crescimento microbiano, com provável produção

de exopolissacarídeos, após o período de 24 horas, partindo de uma cultura com 12 horas de repicagem.

As porcentagens de adesão das células de *E. coli* K12 foram de 0,0012% e 0,068% para células centrifugadas e não centrifugadas, respectivamente. Comparando-se esses resultados com células de *Listeria innocua* L6a e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, nas quais a adesão em aço inoxidável foi de  $2,0 \times 10^1$  e  $5,0 \times 10^1$  para tempo 0 e  $5,0 \times 10^4$  e  $1,0 \times 10^5$  após 12 horas respectivamente (PARIZZI, 1999).

Células de *S. aureus* e de *E. coli* apresentaram a capacidade de aderir em PEBD a diferentes temperaturas de adesão e com diferentes números iniciais de células (SILVA, 2000). Os percentuais de adesão para *S. aureus* variaram de 0,009% a 0,106% a 8°C e de 0,036 a 0,107% a 18°C. Para *E. coli*, os valores percentuais de adesão variaram de 0,001 a 0,006% a 8°C e de 0,002 a 0,028 a 18°C.

Já, a adesão de *Listeria monocytogenes* em vidro sob condições de imersão a 37°C após 48 horas foi de  $1 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> (CHAE et al., 2000).

A adesão em aço inoxidável de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium* foi de, respectivamente 5,83% e 2,21%, após 12 horas e 18°C (FIGUEIREDO et al., 1999), a maior adesão de *Pseudomonas aeruginosa*, pode ser explicada pela maior produção de exopolissacarídeo, que possui papel importante na adesão dos microrganismos às superfícies (ZOTTOLA, 1997).

#### 4.4. Avaliação do procedimento de higienização em linha de leite pasteurizado pelas técnicas da bioluminescência e contagem de aeróbios mesófilos.

As análises de variâncias, apresentadas nos Quadros 10 e 11, mostram que a quantidade de ATP total expressa em log<sub>10</sub> de URL, e o número de mesófilos aeróbios, expresso em log<sub>10</sub> de UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente, apresentaram diferenças significativas (p<0,01), entre as diferentes superfícies de equipamentos e utensílios de uma linha de pasteurização de leite e, também, quando estes parâmetros foram avaliados antes e após o

procedimento de higienização. Por outro lado, não houve interação significativa dos fatores superfície e higienização.

Quadro 10 - Análise de variância dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas de Luz (URL) para ATP total em diferentes superfícies de uma linha de pasteurização de leite, antes e após o procedimento de higienização.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO
Superfície	5	0,9077*
Higienização	1	3,1569**
Sup x Higienização	5	0,2690 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,3380

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

ns não significativo

Quadro 11 - Análise de variância dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) de contagem de mesófilos aeróbios, expressa em UFC/cm<sup>2</sup>, em diferentes superfícies de uma linha de pasteurização de leite, antes e após o procedimento de higienização.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO
Superfície	5	2,6787**
Higienização	1	37,7626**
Sup x Higienização	5	0,7096 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,4653

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

ns não significativo

As superfícies de tanque de resfriamento leite cru (TRC) apresentou uma maior quantidade de ATP do que tanque de equilíbrio do pasteurizador (TEP), com  $\log_{10}$  de URL respectivamente, 4,28 e, 3,26, quando analisado pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) (Quadro12). Não houve diferença entre a quantidade de ATP total encontrada nas superfícies do

TRC, da desnatadeira (DES), do tanque de armazenamento leite pasteurizado (TLP), do caminhão tanque (CAT) e tanque empacotamento de leite pasteurizado (TEL). Também, não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre a quantidade de ATP total encontrado nas superfícies do TEP, do TEL, do CAT, do TLP e da DES.

Quadro12 - Médias dos logaritmos decimais ( $\log_{10}$ ) de Unidades Relativas Luz (URL) para ATP total em diferentes superfícies de uma linha de pasteurização de leite, antes e após o procedimento de higienização.

Superfícies	Médias
Tanque de resfriamento de leite cru	4,28 <sup>a</sup>
Desnatadeira	4,03 <sup>a b</sup>
Tanque de leite pasteurizado	3,66 <sup>a b</sup>
Caminhão tanque	3,55 <sup>a b</sup>
Tanque de empacotamento de leite	3,40 <sup>a b</sup>
Tanque de equilíbrio do pasteurizador	3,26 <sup>b</sup>

\* Médias, com mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Em relação às análises microbiológicas, constatou-se que as superfícies de DES e TRC apresentaram as maiores contagens de mesófilos aeróbios –  $\log_{10}$  de 2,91 e 2,85, respectivamente. Estas superfícies apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey no número de microrganismos quando comparadas às superfícies de TLP e CAT, cujos  $\log_{10}$  foram, respectivamente, 1,47 e 1,39 (Quadro 13).

Não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre a contagem de mesófilos aeróbios nas superfícies da DES, do TRC, do TEP e do TEL. Por outro lado, não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre a contagem de mesófilos aeróbios nas superfícies do CAT, TLP, TEL e TEP.

Quadro 13 - Médias dos logaritmos decimais da contagem de mesófilos aeróbios, expressa em UFC/cm<sup>2</sup>, em diferentes superfícies de uma linha de pasteurização de leite, antes e após o procedimento de higienização.

Superfícies	Médias
Desnatadeira	2,91 <sup>a</sup>
Tanque de resfriamento de leite cru	2,85 <sup>a</sup>
Tanque de equilíbrio do pasteurizador	1,92 <sup>a b</sup>
Tanque de empacotamento de leite	1,78 <sup>a b</sup>
Tanque de leite pasteurizado	1,47 <sup>b</sup>
Caminhão tanque	1,39 <sup>b</sup>

\* Médias, com mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os resultados mostram que para ambas as técnicas de avaliação do procedimento de higienização as superfícies da DES e do TRC foram aquelas que se apresentavam em piores condições higiênicas. No entanto, não há uma concordância entre as duas técnicas na classificação das condições higiênicas das demais superfícies. Os resultados sugerem, assim, não haver uma relação direta entre URL e UFC/cm<sup>2</sup>. Portanto, a técnica de ATP-bioluminescência apenas pode ser usada como indicadora das condições higiênicas associadas às quantidades de matéria orgânica nas superfícies. Ou seja, se o procedimento de higienização foi efetuado corretamente ou não. Esta informação é importante, pois a presença de resíduo nas superfícies podem originar processos de adesão microbiana e formação de biofilmes (ZOTTOLA, 1997).

No experimento, o número de microrganismos aderidos indica uma adesão bacteriana, atingindo cerca de 10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup> e não formação de biofilmes.

A não relação entre as duas técnicas também foi constatada numa pesquisa com três sistemas comerciais de bioluminescência que foram utilizados em diversas etapas de sanificação de superfícies no sistema CIP,

numa cervejaria (ODEBRECHT et al., 2000). Além disso, estes pesquisadores verificaram que o aumento constante de unidades relativas de luz (URL) não acompanhou o aumento de contaminação microbiana.

Os resultados mostram que tanto a concentração de ATP total e a contagem de mesófilos aeróbios foram diferentes ( $p < 0,05$ ) quando se comparou antes e após o procedimento de higienização, considerando todas as superfícies avaliadas. Para a contagem microbiana, encontrou-se o  $\log_{10}$  de 3,08, correspondentes a  $1,20 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, antes da higienização e o  $\log_{10}$  de 1,03, correspondentes a  $1,10 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>, após a higienização (Quadro12). Verifica-se, portanto, que o procedimento de higienização reduziu, em média, a contagem de mesófilos de aeróbios em 99,1%. Para a concentração de ATP total, encontraram-se os valores de  $\log_{10}$  de URL de 3,99, correspondentes a 9772 URL, antes da higienização e de  $\log_{10}$  de URL de 3,40, corresponde a 2511 URL.

Os resultados evidenciam, ainda, que o número médio de mesófilos aeróbios nas superfícies encontra-se acima das recomendações da APHA (1992) - 2UFC/cm<sup>2</sup>- mas atendem as recomendações de outros órgãos como a OMS e a OPAS - 50 UFC/cm<sup>2</sup>. Pode-se, assim, concluir que as superfícies após a higienização estavam em condições higiênicas adequadas se for usada uma especificação menos rígida do que aquela proposta pela APHA. No entanto, as superfícies estavam em condições higiênicas insatisfatórias, quando avaliadas pela técnica do APT total, que determinou a concentração de 2511 URL, muito acima de 150 URL, recomendando (BIOTRACE, 2000).

Durante o experimento, constatou-se uma grande variação nas medidas de URL e também que o controle apresentava leituras diferentes. Embora, não tenha sido feito nenhuma análise estatística, acredita-se que estes fatos podem afetar a avaliação das condições higiênicas das superfícies. De forma semelhante, ODEBRECHT et al. (2000) observaram também que alguns kits já continham bioluminescência antes mesmo de sua aplicação em superfícies, e sugeriu que isto poderia interferir na análise dos resultados, aumentando o valor de URL.

Uma outra maneira de se avaliar as técnicas de contagem de mesófilos aeróbios e a de bioluminescência é pela porcentagem de superfícies higienizadas que atendem as recomendações da APHA, da OMS em relação à

contagem de mesófilos aeróbios e que atendem à recomendação da técnica de ATP-bioluminescência.

Verifica-se pelo Quadro 14, que a técnica da bioluminescência, considerou 100% das superfícies em condições higiênicas insatisfatórias, quanto ao procedimento de higienização. A contagem microbiana detectou 50% de superfícies em condições higiênicas insatisfatórias, considerando a recomendação da APHA e 28% a recomendação da OMS.

Quadro 14 - Porcentagem de superfícies considerada não higienizadas por diferentes recomendações.

	Recomendação	Porcentagem
APHA	até 2 UFC/cm <sup>2*</sup>	50
OMS	até 50 UFC/cm <sup>2*</sup>	28
ATP Total	até 150 URL*	100

\* Valores para superfícies consideradas em condições higiênicas satisfatórias

\*\* Valores para superfícies consideradas em situação de alerta para as condições higiênicas.

\*\*\* Valores para superfícies consideradas em condições higiênicas insatisfatórias.

Novamente, estes resultados suportam a hipótese de que a técnica de ATP-bioluminescência apresenta resultados diferentes dos métodos de contagem bacteriana, sugerindo a influência de resíduos, oriundos da má higienização, na medida da quantidade de ATP total nas superfícies.

Resultados de uma pesquisa que avaliou quatro plantas de processamento de leite com problemas de vida-de-prateleira deste produto, utilizando a técnica de ATP-bioluminescência e a técnica de contagem padrão total, para 86 locais na linha de pasteurização confirmam a não consistência entre as avaliações feitas pelas duas técnicas (MURPHY et al. 1998). A técnica de ATP-bioluminescência considerou como em condições higiênicas satisfatórias (< 100 URL) 31 superfícies avaliadas, que corresponde 36%.

No entanto, em 65% dessas superfícies foram encontrados microrganismos contaminantes pela técnica de contagem padrão. Este resultado sugere que o método convencional é mais sensível que o de ATP

quando o ATP total é inferior a 100 URL. Nas 11 superfícies (12,8%) consideradas suspeitas pela técnica do ATP-bioluminescência (100 a 149 URL) foram detectados microrganismos contaminantes em 91%, e para as 44 superfícies (51,2%) considerados não higienizados (>150 URL), foram detectados microrganismos contaminantes em 78% dos locais pela técnica de contagem padrão e em 22% dos locais não foram detectados microrganismos. Este resultado sugere que a técnica de ATP bioluminescência detecta ATP não microbiano presente em resíduos de filme de leite.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

O controle higiênico-sanitário nas linhas de processamento de alimentos contribui para a obtenção de alimentos com qualidade, de forma a atender aos padrões legais vigentes e as exigências dos mercados consumidores.

Técnicas rápidas para o controle de condições higiênicas de superfícies de processamento de alimentos e, também, qualidades microbiológicas de água e alimentos têm sido avaliadas como alternativas às contagens microbiológicas convencionais.

A técnica de ATP-bioluminescência, que consiste na determinação da concentração de ATP de origem bacteriana ou não, foi usada para avaliar condições de potabilidade de água, a 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.

A quantificação de ATP expressa em URL, foi efetuada pelo luminômetro UNILITEXcel da Biotrace. E a quantificação de microrganismos pelas técnicas de contagem em placas de mesófilos aeróbios, sendo expressa em UFC/mL, para água e expressa em UFC/cm<sup>2</sup>, para as superfícies. Já enumeração de coliformes totais, foi expressa em NMP/10mL, no caso de água.

Em relação às análises de água, os resultados mostraram uma concordância entre as técnicas de ATP-bioluminescência, independente da origem do ATP - total, microbiano ou livre - e a contagem bacteriana para a água industrial e do manancial de captação para tratamento na ETA/UFV. Ambas as técnicas classificaram a água industrial como potável - <150 URL, <2NMP/100mL. A água do manancial, cuja característica principal é elevada contagem bacteriana, foi classificada como em condições higiênicas insatisfatórias, cerca >500 URL para ATP total e atingindo aproximadamente 1000 NMP/100mL. A água de resfriamento de amônia foi classificada em situação de alerta para condições higiênicas, pela concentração ATP total e livre com valores de 295 e 205 URL, respectivamente. Por outro lado, a concentração de ATP microbiano classifica esta água como em condições higiênicas satisfatórias. No entanto, as análises de coliformes totais e mesófilos aeróbios indicam que a água de resfriamento de amônia apresenta um elevado número de microrganismos: 242 NMP/100mL e  $1,70 \times 10^4$  UFC/mL.

Pode-se sugerir que a qualidade físico-química da água de resfriamento de amônia tenha influenciado a determinação da bioluminescência, diminuindo a formação de luz. Esta água apresentou valores elevados de turbidez, pH, alcalinidade, cloretos e dureza. Deve-se, salientar, que a determinação de ATP-bioluminescência não identifica as espécies bacterianas contaminantes. Os resultados sugerem que a determinação de ATP total é a recomendada para avaliar a classificação microbiológica dos tipos de água analisados.

A técnica da bioluminescência considerou que as superfícies de aço inoxidável e polietileno aderidos com esporos de *Bacillus sporothermodurans* estavam em condições higiênicas satisfatórias, todas abaixo de 150 URL ( $\log_{10} < 2,18$ ). Por outro lado, avaliado pela contagem padrão em placas, as superfícies são classificadas como inadequadas para processamento de alimentos. Nas condições deste experimento, a técnica da bioluminescência não é apropriada para avaliar a presença de esporos de *B. sporothermodurans* em ambas superfícies.

A determinação das URL foi afetada pelas condições de adesão da *Escherichia coli*. A suspensão microbiana centrifugada associada ao tempo de

repicagem do microrganismo interferiu na avaliação pela técnica da bioluminescência e também na quantidade de células aderidas.

A concentração de ATP total e a contagem de mesófilos aeróbios foram diferentes ( $p < 0,05$ ) quando se comparou antes e após o procedimento de higienização, considerando todas as superfícies avaliadas. Para a contagem microbiana, encontrou-se o  $\log_{10}$  de 3,08, correspondentes a  $1,20 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, antes da higienização e o  $\log_{10}$  de 1,03, correspondentes a  $1,10 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>, após a higienização

Não foi observada uma concordância entre as duas técnicas na classificação das condições higiênicas para a maioria das superfícies avaliadas. Os resultados sugerem, assim, não haver uma relação direta entre URL e UFC/cm<sup>2</sup>. Portanto, a técnica de ATP-bioluminescência pode ser usada como indicadora das boas condições de limpeza.

Esta informação é importante, pois a presença de resíduos nas superfícies pode originar processos de adesão microbiana e formação de biofilmes. No experimento, o número de microrganismos aderidos indica uma adesão bacteriana, atingindo cerca de  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> e não formação de biofilmes.

Os resultados evidenciam a necessidade de pesquisas adicionais para avaliar a:

- a) Influência de resíduos de alimentos, tais como gordura, proteína, carboidratos e sais minerais na intensidade de formação de luz.
- b) Influência de células somáticas e/ou vegetais na intensidade de formação de luz.
- c) Influência da fase de crescimento microbiano na intensidade de formação de luz.
- d) Definir os valores de URL para aceitação, alerta, e rejeição de superfícies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, N. J., MARTYN, M. E. L., A água na indústria de alimentos. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1982, 38p.
- ANDRADE, N. J. ; MACÊDO, J. A.** Higienização na indústria de alimentos. São Paulo: Editora Varela, 1996. 182p.
- ANDRADE, N. J., AJAO, B. D., ZOTOLLA, E. A.** Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. Journal Food Protection, V.61, n.11, p. 1454-1458, 1998.
- ANDRADE, N. J., SERRANO, A. M.** Use of *Bacillus subtilis* spores to evaluate the efficiency of sodium hypochlorite at different concentration and pH values. Revista Microbiologia, V.24, n.1, p.26-31, 1993.
- 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. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.

**BAL' A, M. F. A., JAMILAH, D. e MARSHALL, D. L. Attachment of *Aeromonas hydrophila* to stainless steel surfaces. Dairy, Food and Environmental Sanitation, V.18, n.10, p. 642-649, 1998.**

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

**BARRICHELO, A., ALLIL, M.C.A. Bioluminescência: uma nova ferramenta para tornar o controle microbiológico mais rápido, fácil e preciso. Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes, Juiz de Fora, V.52, n.300, p.71-79, 1997.**

**BASOI, L. J., ABREU, R.M. Tratamento de águas residuárias. In: Recuperação da Qualidade das Aguas. São Paulo: CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1988, 21p.**

**BEER, D.;SRINIVASAM, R., STEWART, S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilm during disinfection. Applied Environmental Microbiology, V.60, p. 4339-4344, 1994.**

**BIOTRACE. BIOTRACE Xcel. [S.l]. 2000. (Manual técnico, 140p).**

**BOWER, C. K., McGUIRE, J., DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. Trends in Food Science Technology, V.7, p.152-157, 1996.**

**BRASIL. Leis, Decretos, etc... Resolução CONAMA nº20, de 18 de junho de 1986, Classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, p.11356-11361, 30 de julho. 1986,Seção 1.**

**BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria nº36, de 19 de janeiro de 1990, Normas e padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, V.18, n.16, p.1651-1654, 23 de janeiro. 1990.Seção 1.**

**BRASIL. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Estabelece padrões microbiológicos de alimentos. Diário Oficial ( da República Federativa do Brasil), Brasília, 22 de setembro. 1997.**

**BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria nº1469, de 29 de dezembro de 2000, Normas e padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília.**

**BRASIL. Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Estabelece padrões microbiológicos de alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde.**

**CABRAL, B. P. O. Avaliação da radiação ultravioleta no controle de esporos de *Bacillus sporothermodurans* aderidos em polietileno de baixa densidade usado como embalagem de alimentos. Relatório Final. PIBIC/CNPq/UFV, Viçosa, 2001.**

**CERRI, M. E. N. F. Sensitividade à radiação gama de *Escherichia coli* em três substratos e estudo das suas alterações ao microscópio eletrônico. Piracicaba, SP: ESALQ, 1984. 51p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura)- Escola Superior de Agricultura " Luiz de Queiroz " da Universidade de São Paulo, 1984.**

**CHAE, M. C. ; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. International J. Food Microbiol. V.62, p.103-111, 2000.**

- 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.**
- CHAE, M. C.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different Listeria monocytogenes strains. International J. Food Microbiol. V.62, p.103-111, 2000.**
- CRIADO, M. T.; SUAREZ, B., FERREROS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. Food Technology, V.48, p.123-126, 1994.**
- CROMBRUGGE, 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. 53-60, 1991a.**
- CROMBRUGGE, V., WAES, G. Methods for assessing the bacteriological quality raw milk from the farm. Impedance method. Bulletin of the International Dairy Federation, n.256, p. 41-44, 1991b.**
- D' AGUILA, P. S., ROQUE, O. C. C., MIRANDA, C. A. S., FERREIRA, A. P. Avaliação da qualidade de água para o abastecimento público do município de Nova Iguaçu. Caderno de Saúde Pública, V.16, n.3, p.791-798, 2000.**
- ELEY, A. Microbial food poisoning, 2<sup>a</sup> ed, London: Chapman & Hall., 210p,1996.**
- FIGUEIREDO, H. M.; REIS, R. C., ANDRADE, N. J. Capacidade de adesão de diferentes microrganismos em sistema simulador de linha de processamento de leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1999, Salvador. Anais... Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. P.383.**

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

**GREEN, T. A., RUSSEL, S. M. e FLETCHER, D. L. Effect of chemical sanitizing agents on ATP bioluminescence measurements. Journal Food Protection, V.61, n.8, p. 1013-1017, 1998.**

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

**GREENBERG, A. E, CLESCERI, L. S., EATON, A. D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18<sup>th</sup> Edition. 1992 APHA**

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

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

**HERMAN, L., HEYNDRIKX and WAES, G. Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR. Letters-in-Applied-Microbiology, V.26, n.3, p.183-188. 1998.**

**INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS- ICMSF. Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration. Toronto: Acribia, 1978. V.1.**

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

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

**MACÊDO, J. A. B.** Águas & Águas. Juiz de Fora- MG: Ortofarma, 2000.

**MARRIOTT, N.G.** Principles of food sanitation. 3<sup>d</sup> ed. New York: Chapman & Hall, 1995. 421p.

**MOSTELLER, T. M. BISHOP, J.R.** Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. *Journal Food Protection*, **V.56**, n.1, p.34-41, 1993.

**MURPHY, S. C. ; KOZLOWSKI,S. M. ; BLANDER, D. K. ; BANDLER, D.K. e BOOR, K. J.** Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. *Journal Food Science*, **V.81**, n.3, p. 817-820, 1998.

**ODEBRECHT, E.; SCHMIDT, H-J.; FRANCO, B. G. M.** Avaliação do desempenho de dois equipamentos e um kit que medem a bioluminescência para determinar a eficiência da sanitização de superfícies durante os CIP de uma cervejaria brasileira. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2000, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000. P.4.168

**OLIVEIRA, A. D.** Eficiência do ácido peracético sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans*. Viçosa, MG, 2001 p.73 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.

**PARIZZI, S. Q. F.** Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas. Viçosa, MG, 1999 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, 1999

**PORETTI, M. Quality control of water as raw material in food industry. Food Control, p.79-83, 1990.**

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

**STANNARD, C. J., WOOD, J. M. The rapid estimation of microbiology contamination of raw meat by measurement of adenosine triphosphate. J.Appl. Bacteriol, V.55, p.429-438, 1983.**

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

**TROLLER, J. A. Sanitation in food processing. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1993. 478p.**

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

**ZACARCHENCO, P. B., LEITÃO, M. F. F., DESTRO, M. T., ANDRIGHETO, C. Ocorrência de Bacillus sporothermodurans em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. Ciência e Tecnologia de Alimentos, V.20, n.3, p.363-368, 2000.**

**ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilmes formation: a new problem for the food industry? Food Technology, V.48, n.7, p.107-114, 1994.**

**ZOTTOLA, E. A. Special techniques for studying microbial biofilms in food systems.In: TORTORELLO, M. L. & GENDEL, S. M. Food microbiological anaysis- New technologies- IFT Basic Symposia, Marcell Dekker, p. 315-346, 1997.**

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

WEI, C., COOK, D. L., KIRK, J. R. Use of chlorine compounds in the food industry. Food Technology, V.39, n.1 p.107-115, 1985.

## APÊNDICE

**Quadro 1 – Médias de três repetições de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) para as superfícies antes do procedimento de higienização.**

Superfície	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média
Tanque de resfriamento de leite cru	-	$1,22 \times 10^3$	$2,14 \times 10^4$	$1,13 \times 10^3$
Desnatadeira	$1,31 \times 10^3$	$7,40 \times 10^3$	$6,35 \times 10^3$	$5,02 \times 10^3$
Tanque de leite pasteurizado	$1,75 \times 10^2$	$1,58 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$2,08 \times 10^3$

<b>pasteurizado</b>				
<b>Caminhão tanque</b>	<b>1,50 X 10<sup>2</sup></b>	<b>8,90 X 10<sup>3</sup></b>	<b>1,10 X 10<sup>2</sup></b>	<b>3,05 X 10<sup>3</sup></b>
<b>Tanque de empacotamento leite</b>	<b>9,85 X 10<sup>2</sup></b>	<b>1,07 X 10<sup>4</sup></b>	<b>3,90 X 10<sup>2</sup></b>	<b>4,03 X 10<sup>3</sup></b>
<b>Tanque de equilíbrio do pasteurizador</b>	<b>4,05 X 10<sup>2</sup></b>	<b>5,45 X 10<sup>3</sup></b>	<b>6,80X 10<sup>1</sup></b>	<b>1,97 X 10<sup>3</sup></b>

**Quadro 2 – Médias de três repetições de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) para as superfícies após o procedimento de higienização.**

<b>Superfície</b>	<b>Repetição 1</b>	<b>Repetição 2</b>	<b>Repetição 3</b>	<b>Média</b>
<b>Tanque de resfriamento de leite cru</b>	<b>1,53 X 10<sup>2</sup></b>	<b>5,60 X 10<sup>1</sup></b>	<b>4,25 X 10<sup>2</sup></b>	<b>2,11 X 10<sup>2</sup></b>
<b>Desnatadeira</b>	<b>4,30 X 10<sup>1</sup></b>	<b>1,90 X 10<sup>2</sup></b>	<b>5,34 X 10<sup>2</sup></b>	<b>2,56 X 10<sup>2</sup></b>
<b>Tanque de leite pasteurizado</b>	<b>4,60 X 10<sup>-1</sup></b>	<b>1,63X 10<sup>0</sup></b>	<b>4,25 X 10<sup>-1</sup></b>	<b>8,38 X 10<sup>-1</sup></b>
<b>Caminhão tanque</b>	<b>8,50 X 10<sup>-2</sup></b>	<b>1,00 X 10<sup>-1</sup></b>	<b>1,50 X 10<sup>-1</sup></b>	<b>1,12 X 10<sup>-1</sup></b>
<b>Tanque de empacotamento leite</b>	<b>6,25 X 10<sup>-1</sup></b>	<b>6,50 X 10<sup>0</sup></b>	<b>1,00 X 10<sup>-4</sup></b>	<b>2,38 X 10<sup>0</sup></b>
<b>Tanque de equilíbrio do pasteurizador</b>	<b>5,30 X 10<sup>-1</sup></b>	<b>1,20 X 10<sup>2</sup></b>	<b>6,80X 10<sup>1</sup></b>	<b>1,97 X 10<sup>3</sup></b>

**Quadro 3 – Médias de três repetições de Unidades Relativas de Luz (URL) para as superfícies antes do procedimento de higienização.**

<b>Superfície</b>	<b>Repetição 1</b>	<b>Repetição 2</b>	<b>Repetição 3</b>	<b>Média</b>
<b>Tanque de resfriamento de leite cru</b>	<b>3910</b>	<b>500000</b>	<b>33118</b>	<b>179009</b>
<b>Desnatadeira</b>	<b>61119,50</b>	<b>22885</b>	<b>24165</b>	<b>36056</b>
<b>Tanque de leite pasteurizado</b>	<b>3484,50</b>	<b>5388,50</b>	<b>3426</b>	<b>4099,6</b>
<b>Caminhão tanque</b>	<b>13121</b>	<b>9183,50</b>	<b>13871</b>	<b>12058</b>
<b>Tanque de empacotamento leite</b>	<b>21215,50</b>	<b>3118,50</b>	<b>1893</b>	<b>8742,3</b>
<b>Tanque de equilíbrio do pasteurizador</b>	<b>916</b>	<b>1577</b>	<b>15985</b>	<b>6159,3</b>

**Quadro 4 – Médias de três repetições de Unidades Relativas de Luz (URL)  
para as superfícies após o procedimento de higienização.**

<b>Superfície</b>	<b>Repetição 1</b>	<b>Repetição 2</b>	<b>Repetição 3</b>	<b>Média</b>
<b>Tanque de resfriamento de leite cru</b>	<b>492,50</b>	<b>83369</b>	<b>18094</b>	<b>33985</b>
<b>Desnatadeira</b>	<b>61119,50</b>	<b>22885</b>	<b>24165</b>	<b>36056</b>
<b>Tanque de leite pasteurizado</b>	<b>16765,50</b>	<b>3407</b>	<b>2486</b>	<b>7552,80</b>
<b>Caminhão tanque</b>	<b>13121</b>	<b>9183,50</b>	<b>13871</b>	<b>12058</b>
<b>Tanque de empacotamento leite</b>	<b>21215,50</b>	<b>3118,50</b>	<b>1893</b>	<b>8742,3</b>
<b>Tanque de equilíbrio do pasteurizador</b>	<b>724</b>	<b>1166</b>	<b>1776</b>	<b>1222</b>