

ANA MÁRCIA DE FARIA MORELLI

Escherichia coli O157:H7: OCORRÊNCIA EM AMBIENTE DE PRODUÇÃO DE LEITE
NA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA, ADESÃO EM DIFERENTES SUPERFÍCIES E
RESISTÊNCIA A SANITIZANTES.

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

Viçosa
Minas Gerais – Brasil
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M842e
2008

Morelli, Ana Márcia de Faria, 1974-

Escherichia coli 0157:H7: ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes / Ana Márcia de Faria Morelli. – Viçosa, MG, 2008.
xvii, 173f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli*. 2. Leite - Microbiologia. 3. Leite - Contaminação. 4. Leite - Qualidade. 5. Leite - Análise. 6. Bactéria - Adesão. 7. Contagem de placas. 8. Microscopia eletrônica. 9. Modelos matemáticos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.342

ANA MÁRCIA DE FARIA MORELLI

Escherichia coli O157:H7: OCORRÊNCIA EM AMBIENTE DE PRODUÇÃO DE LEITE
NA MICRORREGIÃO DE VIÇOSA, ADESÃO EM DIFERENTES SUPERFÍCIES E
RESISTÊNCIA A SANITIZANTES.

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

Aprovada em: 28 de abril de 2008.

Prof. José Antônio Marques Pereira

Prof. Nélio José de Andrade

Prof. Wilmer Edgard Luera Pena

Dr^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof^a. Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

A **Deus**, que está presente em todos os momentos da minha vida me dando saúde, compreensão e força para buscar meus objetivos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais Jonas e Marisa, fonte de inesgotável amor e compreensão, aos quais devo todas as minhas conquistas, pelo incentivo, pela dedicação e apoio sempre presentes.

Ao meu marido Marquinho, pelo grande carinho e pela compreensão em todos os momentos difíceis vividos durante a realização deste trabalho. Adicionalmente, pelos comentários, sugestões e revisões, que em muito ajudaram na elaboração desta pesquisa.

Aos meus irmãos Sandra, Gustavo e Andréa pelo incentivo e profunda amizade.

Aos meus sobrinhos Giuliana e Gabriel que me enchem de alegria.

À Prof^a Regina Célia Santos Mendonça pelo conhecimento, companheirismo, dedicação e otimismo em todos os momentos do doutorado não deixando as dificuldades atrapalharem a construção do novo caminho a ser percorrido.

Aos professores José Antônio Marques Pereira, Nélio José de Andrade e Wilmer Edgard Luera Pena e a Dr^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto – pesquisadora da Epamig - que com simpatia aceitaram participar da banca de defesa desta tese.

Aos professores José Antônio e Edgard que com boa vontade prestaram esclarecimentos essenciais para a compreensão da modelagem matemática.

À Dr^a Cláudia Alencar Vanetti, técnica do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pela ajuda, pelos ensinamentos e esclarecimentos.

À amiga Roberta por nunca negar esforços para ajudar em todos os momentos, demonstrando companheirismo e amizade.

As estagiárias Maráisa, Deyse, Gabriela e Ana Paula pela amizade e pela ajuda indispensável na realização dos experimentos e análises laboratoriais.

Aos colegas de laboratório: Arthur, Cida, Daniela, Daniele, Evelyn, Fernanda, Iara, Joelma, Júnia, Micaela, Patrícia Bernardes, Patrícia Fernandes, Priscila, Roberta e Sílvia.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, especialmente Vandick, Pio, Tomaz (Perereca), Geralda, Vaninha, Juarez, Sr. Manoel e Sr. Luiz.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

BIOGRAFIA

ANA MÁRCIA DE FARIA MORELLI, filha de Jonas de Sousa Morelli e Marisa de Faria Morelli, nasceu em Recife, Estado de Pernambuco, em 21 de novembro de 1974.

Em 1993 ingressou na Universidade Federal do Maranhão – UFMA, onde, em 1998, graduou-se em Química Industrial.

Em março de 2001, iniciou o curso de mestrado em Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal do Ceará – UFC, defendendo a dissertação em março de 2003.

Em março de 2004, iniciou o curso de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, defendendo a tese em abril de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS-----	ix
LISTA DE FIGURAS-----	xi
RESUMO-----	xii
ABSTRACT-----	xv
1 INTRODUÇÃO GERAL-----	1
2 OBJETIVOS GERAIS-----	3
CAPÍTULO 1 CONTAMINAÇÃO POR COLIFORMES TERMOTOLERANTES E <i>Escherichia coli</i> O 157 EM PROPRIEDADES RURAIS DE CRIAÇÃO DE GADO LEITEIRO-----	4
1.1 INTRODUÇÃO-----	4
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	6
1.2.1 Produção e consumo de leite no Brasil-----	6
1.2.2 A importância e a qualidade do leite-----	11
1.2.3 Qualidade microbiológica do leite produzido no Brasil-----	13
1.2.4 Instrução Normativa nº 51-----	14
1.2.5 Microbiota do leite cru-----	16
1.2.6 Microbiota do exterior de úberes e tetas-----	21
1.2.7 Fontes ambientais-----	22
1.2.8 Microbiota dos equipamentos de ordenha-----	23
1.2.9 Surtos de toxinfecção alimentar-----	25
1.2.10 O grupo coliformes-----	28
1.2.11 <i>Escherichia coli</i> -----	29
1.2.12 <i>Escherichia coli</i> O157:H7-----	30
1.2.12.1 Caracterização-----	30
1.2.12.2 Sorotipagem-----	31

1.2.12.3	Patogenia-----	32
1.2.12.4	Reservatório animal-----	35
1.2.12.5	Transmissão de infecção-----	37
1.2.12.6	Fatores que afetam a sobrevivência e o crescimento-----	40
1.2.12.7	Surtos causados por <i>Escherichia coli</i> O157-----	44
1.3	MATERIAL E MÉTODOS-----	47
1.3.1	Coleta de dados / amostras-----	47
1.3.2	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes-----	51
1.3.3	Isolamento de <i>E. coli</i> O157-----	53
1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	55
1.4.1	Prevalência de coliformes termotolerantes em propriedades rurais de criação de gado leiteiro-----	55
1.4.2	Prevalência de <i>Escherichia coli</i> O157 em propriedades rurais de criação de gado leiteiro-----	60
1.5	CONCLUSOES-----	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	63
	CAPÍTULO 2 ADESÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 EM SUPERFÍCIES UTILIZADAS EM PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS-----	83
2.1	INTRODUÇÃO-----	83
2.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	85
2.2.1	Adesão bacteriana-----	85
2.2.2	Biofilmes bacterianos-----	87
2.2.3	Superfícies utilizadas no processamento de alimentos-----	93
2.2.4	Técnicas para determinação da adesão bacteriana-----	96
2.3	Modelagem matemática e validação dos modelos preditivos-----	99
2.3.1	Modelos de primeiro nível-----	100
2.3.2	Modelos de segundo nível-----	101
2.3.3	Modelos de terceiro nível-----	101
2.3.4	Validação matemática-----	102
2.3.4.1	Fator bias-----	102
2.3.4.2	Fator exatidão-----	103
2.3.5	Modelo de superfície de resposta-----	103

2.3.6	Coeficiente de determinação ou coeficiente de regressão-----	104
2.4	MATERIAL E MÉTODOS-----	106
2.4.1	Avaliação da formação de biofilmes por <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC43895) -----	105
2.4.1.1	Delineamento experimental-----	105
2.4.1.2	Superfícies avaliadas-----	105
2.4.1.3	Microrganismo, preparo dos cupons e prova de adesão-----	106
2.4.1.4	Contagem padrão em placas-----	107
2.4.2	Microscopia eletrônica de varredura -----	107
2.4.3	Modelar e avaliar matematicamente a formação de biofilmes-----	108
2.4.3.1	Planejamento experimental-----	108
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	111
2.5.1	Adesão de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em diferentes superfícies de processamento pela contagem padrão em placas-----	111
2.5.2	Avaliação da adesão de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em diferentes superfícies de processamento por microscopia eletrônica de varredura--- -----	114
2.5.3	Avaliação da adesão de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em diferentes superfícies de processamento por implementação de um desenho composto central rotacional-----	115
2.5.4	Verificação experimental dos modelos encontrados-----	128
2.6	CONCLUSÕES-----	129
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	131
	CAPÍTULO 3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SANITIZANTES COMERCIAIS CONTRA <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7-----	141
3.1	INTRODUÇÃO-----	141
3.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	143
3.2.1	Sanitizantes usados na indústria de alimentos-----	143
3.2.2	Fatores que influenciam a resistência microbiana-----	149
3.2.3	Métodos de avaliação da eficiência do procedimento de higienização----	150
3.3	MATERIAL E MÉTODOS-----	152
3.3.1	Avaliação da resistência de <i>E. coli</i> O157:H7 a diferentes sanitizantes comerciais-----	152
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	154
3.4.1	Avaliação da resistência de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 a diferentes sanitizantes usados em superfícies de processamento pela contagem padrão em placas-----	154

3.5	CONCLUSÕES-----	160
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	161
	CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	165
	ANEXOS-----	168

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	-----	4
Tabela 1	Classificação mundial dos principais países produtores de leite – 2006-----	7
Tabela 2	Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados, 2005-----	7
Tabela 3	Leite produzido e inspecionado no Brasil (1998-2003), estimando-se a provável parcela destinada ao comércio informal, em bilhões de litros-----	11
Tabela 4	Requisitos microbiológicos para leite cru refrigerado a serem atingidos em diferentes regiões do Brasil-----	15
Tabela 5	Patógenos microbianos para humanos associados com leite e produtos lácteos-----	20
Tabela 6	Valores D* para inativação de <i>Escherichia coli</i> O157:H7-----	42
Tabela 7	Surtos de infecções por <i>Escherichia coli</i> O157:H7 no mundo-----	46
Tabela 8	Variação da contagem de coliformes termotolerantes em ambientes de produção de leite obtida pela técnica do NMP-----	56
CAPÍTULO 2	-----	86
Tabela 1	Dimensões dos cupons das superfícies usados na adesão de <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43895)-----	106
Tabela 2	Matriz do delineamento composto central rotacional-----	110
Tabela 3	Médias da adesão de <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43895), expressas em log UFC.cm ⁻² , em três tipos de superfícies usadas no processamento de alimentos nos tempos de contato de 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 10 h, avaliadas pela técnica da contagem padrão em placas durante o cultivo em caldo nutriente e a 37 °C-----	112
Tabela 4	Médias de contagem de <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43895), aderidas em três tipos de superfícies usadas no processamento de alimentos, avaliadas pela técnica da contagem padrão em placas-----	116
Tabela 5	Resultado da análise de regressão do modelo, equações 6, 7 e 8, para as superfícies em aço inoxidável, PVC _{RG} e PVC _{RF} -----	118
Tabela 6	Resultado da análise de variância do ajuste do modelo, equações 6, 7 e 8, para as superfícies em aço inoxidável, PVC _{RG} e PVC _{RF} -	118
Tabela 7	Coefficiente de determinação para as superfícies em aço	119

	inoxidável, PVC _{RG} e PVC _{RF} -----	
Tabela 8	Ensaaios de verificação experimental dos modelos preditivos nas três superfícies avaliadas-----	128
CAPÍTULO 3	-----	137
Tabela 1	Identificação e composição dos sanitizantes utilizados no presente estudo, respectivos neutralizantes, recomendações de uso pelo fabricante e pHs-----	153
Tabela 2	Resultados dos testes de resistência de <i>E. coli</i> O157:H7 aos sanitizantes empregando-se o método AOAC 960.09-----	154

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	-----	4
Figura 1	Evolução da produtividade da produção leiteira no Brasil (litros/vaca/ano) entre os anos de 1991 e 2005-----	8
Figura 2	Evolução nos cinco Estados brasileiros com maior produção leiteira entre os anos de 1992 e 2002-----	9
Figura 3	Número médio de surtos de <i>E. coli</i> O157 nos EUA no período de 1982 a 2002-----	45
Figura 4	Questionário da avaliação das condições de infra-estrutura e higiênico-sanitárias de propriedades rurais de criação de gado leiteiro-----	48
Figura 5	Mapa da microrregião de Viçosa-----	51
Figura 6	Colônias típicas de <i>E. coli</i> O157:H7 em meio SMAC-----	53
CAPÍTULO 2	-----	86
Figura 1	Mecanismo teórico da formação de biofilmes-----	90
Figura 2	Número de células de <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43895), aderidas em aço inoxidável 304 # 4 (AIN), PVC revestimento grosso com tecido (PVC _{RG}) e PVC revestimento fino com tecido (PVC _{RF}) durante o cultivo em caldo nutriente a 37 °C-----	112
Figura 3	Fotomicrografia de <i>E. coli</i> O157:H7 aderida na temperatura de 37 °C e no tempo de contato de 10 horas-----	115
Figura 4	Gráfico de comparação entre resultados observados e resultados calculados-----	123
Figura 5	Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para adesão de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em aço inoxidável em função do tempo e da temperatura-----	125
Figura 6	Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para adesão de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em PVC _{RG} em função do tempo e da temperatura-----	126
Figura 7	Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para adesão de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em PVC _{RF} em função do tempo e da temperatura -----	127
CAPÍTULO 3	-----	137
Figura 1	Resistência de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 aos diferentes sanitizantes usados na indústria de alimentos-----	159

RESUMO

MORELLI, Ana Márcia de Faria, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2008. *Escherichia coli* O157:H7: Ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes. Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Co-orientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e José Antônio Marques Pereira.

A qualidade microbiológica do leite cru tem recebido grande atenção em função da predominância de altas contagens de aeróbios mesófilos e de coliformes, que são indicativos de contaminação durante o processamento e armazenamento. Os coliformes também podem produzir enzimas que comprometem a qualidade dos derivados a que o leite cru é destinado. Os objetivos desse trabalho foram estudar a possibilidade de ocorrência de *Escherichia coli* O157 na região produtora de leite que abastece a cidade de Viçosa, isolar espécies de coliformes termotolerantes e de *E. coli* O157 de propriedades rurais de criação de gado leiteiro, avaliar a adesão de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 pela contagem padrão em placas (CPP) em diferentes superfícies adotadas em unidades de processamento de alimentos, avaliar e modelar matematicamente a formação de biofilmes de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) nas diferentes superfícies por meio da implementação de um desenho composto central rotacional para os fatores temperatura de exposição e tempo de incubação e avaliar a resistência de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) aos sanitizantes mais amplamente usados na desinfecção de equipamentos e utensílios de indústrias de processamento de alimentos, bem como de restaurantes e cozinhas industriais. Foi verificado uma contagem de coliformes termotolerantes para amostras de leite cru entre $< 0,3$ e 21 NMP.mL^{-1} . Das amostras analisadas, 29 (36,3 %) apresentaram contaminação. Uma contagem entre $< 0,03$

e $> 11,0 \text{ NMP.mL}^{-1}$ de coliformes termotolerantes foi obtida para a água. Isso indicou um perigo potencial para introdução de patógenos no leite por meio da contaminação de tetas, utensílios e equipamentos. Foram isoladas quinze estirpes de *E. coli*, porém, essas estirpes não foram confirmadas como pertencentes ao sorogrupo O157. A incidência de coliformes e de *E. coli* no leite cru tem recebido considerável atenção, em função de sua associação à contaminação de origem fecal e o conseqüente risco de que outros patógenos de origem fecal estejam presentes. Na avaliação da adesão de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 pela contagem padrão em placas (CPP) em diferentes superfícies adotadas em unidades de processamento de alimentos foi observada um aumento da adesão em função do tempo de contato para todas as superfícies avaliadas. Uma menor adesão ocorreu no aço inoxidável e uma maior adesão no PVC_{RF}, após 10 horas de contato. Observou-se pelo teste de Scott-Knott que não houve diferença significativa na adesão do microrganismo ($p > 0,05$) apenas no aço inoxidável para os tempos 2 horas e 4 horas de contato. Nos tempos de contato igual e superior a 6 horas houve diferença significativa na intensidade de adesão em todas as superfícies avaliadas. Avaliando-se cada superfície ao longo dos diferentes tempos de contato, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na adesão do microrganismo. Na observação microscópica verificou-se que a superfície de aço inoxidável apresentou características microtopográficas muito diferentes em relação às demais superfícies, o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão constatados nesse experimento. Foi verificado por meio da implementação do desenho composto central rotacional que os modelos obtidos para as três superfícies foram validados, uma vez que para todas as predições os resultados foram maiores que os valores experimentais encontrados, ou seja, predições tenderam para o lado seguro onde as taxas de adesão preditas foram superiores às reais. Os resultados observados na avaliação da resistência de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 aos sanitizantes mais usados apresentaram uma variação na eficiência com base no número de reduções decimais e no efeito antimicrobiano. Pelo teste da AOAC, adota-se 30 segundos de tempo de contato entre o microrganismo e o sanitizante a ser testado. De acordo com esse critério, os sanitizantes hipoclorito de sódio 100 mg.L^{-1} e 200 mg.L^{-1} , dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L^{-1} , peróxido de hidrogênio 2 %, ácido peracético 30 mg.L^{-1} , extrato de semente “grapefruit” 1:1500 e amônia quaternária 0,20 % atenderam as especificações. Por meio dos resultados reforçou-se a importância do uso de práticas

higiênicas corretas na indústria de alimentos. Sugere-se avaliar os procedimentos de higienização e o uso de agentes sanitizantes mais adequados às superfícies utilizadas nas indústrias de processamento de alimentos.

ABSTRACT

MORELLI, Ana Márcia de Faria, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2008. *Escherichia coli* O157:H7: Occurrence in the area where milk that supplies Viçosa is produced, adhesion on several surfaces and resistance to the sanitizing products. Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Co-adviseres: Antônio Fernandes de Carvalho and José Antônio Marques Pereira.

The microbiological quality of raw milk has been given great attention due to the high count of mesophilic anaerobics and coliforms, which indicate contamination during processing and storing. Coliforms may also produce enzymes that compromise the quality of dairy products of which the raw milk is destined for. The scope of this work was to study the possibility of *Escherichia coli* O157 occurrence in the area where milk that supplies Viçosa is produced, isolate thermotolerant coliforms and *E. coli* O157 strains from rural properties where dairy cattle is raised, evaluate the adhesion of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 by means of the standard plate count (SPC) on several surfaces used in food processing units, evaluate and mathematically model the *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) biofilms formations on different surfaces by implementing a central composite rotational design applicable to the responses of temperature exposition and incubation time, and evaluate the *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) resistance to the sanitizing products which are largely used in the disinfection of industrial food processing equipments and appliances as well as in industrial restaurants and kitchens. Thermotolerants coliforms count for raw milk samples was between $< 0,3$ and 21 NMP.mL^{-1} . Twenty-nine (36,3 %) from the analyzed samples showed contamination. A count varying from $< 0,03$ and $> 11,0 \text{ NMP.mL}^{-1}$ of thermotolerant coliforms was achieved for water. That indicates a potential danger of

pathogens introduction in the milk through udder, appliances and equipments contamination. Fifteen strains of *E. coli* were isolated; however, such strains did not show to belong to the serotyping O157. The incidence of coliforms and *E. coli* in raw milk has been given considerate attention due to its association to fecal contamination and the following risk of other fecal pathogen presence. In the evaluation of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 adhesion by means of the standard plate count (SPC) on several surfaces used in food processing units, it was observed an increase in the adhesion in function of the contact time to all evaluated surfaces. Lower adhesion occurred to the stainless steel and higher adhesion to PVC_{RF} after 10-hour contact. According to the Scott-Knott test, there was no meaningful difference in the microorganism adhesion ($p > 0,05$) only for the stainless steel at 2 and 4 hour contact. There was meaningful differences on the adhesion intensity to all the evaluated surfaces for contact periods equals or higher then 6 hours. Meaningful differences ($p < 0.05$) to the microorganism adhesion when each surface was evaluated through different contact periods were shown. The stainless steel surface when analyzed under the microscope revealed microtopographic characteristics very different from the other surfaces, what may justify the differences among the adhesion rates found in this experiment. It was shown by means of the central composite rotational design implementation that the achieved models for the three surfaces were validated, once the predictions for all results were higher than the values found in the experiment, that is, predictions tended to the safer side where the predicted adhesion rates were higher to the real ones. The results achieved for *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 resistance to the most used sanitizing products showed a variation on the efficiency based on decimal reductions in the antimicrobial effect performed by the different sanitizing products that were evaluated. Following the AOAC test, 30 seconds is adopted as the contact period between the microorganism and the sanitizing product being tested. According to these criteria, the sanitizing products sodium hypochlorite at 100 and 200 mg.L⁻¹, sodium dichloroisocyanurate at 200 mg.L⁻¹, 2 % hydrogen peroxide, peracetic acid at 30 mg.L⁻¹, grapefruit seed extract at 1:1500 and 0.20 % quaternary ammonia answered the specifications. The results showed the importance of proper hygiene practices in the food industry. Thus, it is suggested to evaluate such hygiene procedures and the use of sanitizing agents which are the most adequate to the surfaces used in the food processing industries.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados ainda são uma das principais causas de morbidade em diversos países e, em certas circunstâncias, podem ter sérias conseqüências. Essas enfermidades são denominadas toxinfecções alimentares e a sua maioria é causada pelo consumo de alimentos contaminados com os denominados “perigos biológicos”, representados principalmente por bactérias patogênicas. Países desenvolvidos em todo o mundo enfrentam um crescente aumento destas doenças; especificamente nos EUA, entre 1988 e 2002, cerca de 85 % dos casos de toxinfecções alimentares de etiologia conhecida foram causados por microrganismos.

Apesar do uso de técnicas de processamento de alimentos e de higienização industrial avançadas, o número crescente e a gravidade das doenças de origem alimentar em todo o mundo têm aumentado consideravelmente, o que chama a atenção dos consumidores em relação à qualidade dos alimentos. Atualmente, a segurança alimentar constitui uma preocupação para os consumidores e para a indústria de alimentos, bem como para órgãos responsáveis pela saúde pública.

No Brasil, apesar do desenvolvimento tecnológico atingido em certas indústrias de laticínios, persistem ainda, no setor de produção de leite, graves problemas que depreciam a matéria-prima, que impedem o seu beneficiamento para o consumo “in natura” ou tornam o produto beneficiado impróprio para o consumo humano, mesmo em regiões onde a pecuária leiteira é tradicional.

A higiene e o controle de qualidade do leite e dos produtos lácteos têm como objetivo básico assegurar a sua inocuidade. A presença de números elevados de certos

microrganismos e suas toxinas constituem as causas mais freqüentes de problemas sanitários, além de causarem grandes perdas econômicas.

Os procedimentos higiênicos dispensados durante a obtenção e a manutenção do leite até sua entrada no estabelecimento de beneficiamento determinam o tipo e a quantidade desses contaminantes. A saúde do rebanho leiteiro, as boas práticas durante a ordenha, a conservação do leite em baixa temperatura até o momento do processamento são fundamentais para evitar o crescimento dos microrganismos responsáveis pela deterioração. Estes cuidados são essenciais para a fabricação de produtos derivados com qualidade.

Por outro lado, um grande problema para a indústria de alimentos é o estado higiênico de superfícies de equipamentos processadores de alimentos por serem fontes potenciais de microrganismos deterioradores e patogênicos. A higiene de equipamentos e de utensílios caracteriza-se, fundamentalmente, por adoção de procedimentos em que as superfícies que entram em contato com os alimentos tornam-se sanitariamente adequadas para o processamento. Para isso, devem-se utilizar técnicas corretas de higienização para a garantia de qualidade do produto final.

É possível ocorrer adesão bacteriana e formação de biofilmes em praticamente todas as superfícies envolvidas no processamento de alimentos, desde as rugosas que apresentam fissuras e fendas que podem alojar os microrganismos até as consideradas mais lisas.

Portanto, a adoção de medidas de controle prévias e posteriores à ordenha dos animais é de grande valor para a indústria láctea, pois permite a redução da contaminação por patógenos e evita que os produtos contaminados cheguem até o consumidor.

2. OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Verificar a ocorrência de *Escherichia coli* O157 na região produtora de leite que abastece a cidade de Viçosa;
- ✓ Isolar *Escherichia coli* O157 de leite, fezes, úbere, ração, água, utensílios, equipamentos e ordenhador de propriedades rurais de criação de gado leiteiro;
- ✓ Avaliar a formação de biofilmes de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) nas superfícies de aço inoxidável, PVC revestimento grosso com tecido e PVC revestimento fino com tecido;
- ✓ Modelar matematicamente a formação de biofilmes de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) nas superfícies de aço inoxidável, PVC revestimento grosso com tecido e PVC revestimento fino com tecido através de um planejamento experimental fatorial para os fatores temperatura de exposição e tempo de incubação;
- ✓ Avaliar a resistência de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) aos sanitizantes mais usados na desinfecção de equipamentos e utensílios de indústrias de processamento de alimentos, de restaurantes e cozinhas industriais.

CAPÍTULO 1

Contaminação por coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* O157 em propriedades rurais de criação de gado leiteiro

1.1 INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem animal, frescos ou processados, podem veicular diversos microrganismos patogênicos, causadores de diversas alterações fisiológicas nas pessoas que os consomem (Doenças Transmitidas por Alimentos – DTAs). Essas doenças podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. No entanto, não há dúvidas de que são as bactérias os principais agentes etiológicos das doenças causadas por alimentos, sendo responsáveis por cerca de 70 % dos surtos e 95 % dos casos.

O leite é um alimento que possui um perfeito balanço de nutrientes, fornecendo ao homem macro e micronutrientes indispensáveis ao crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde. Como fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas, torna-se um dos alimentos mais vulneráveis a alterações físico-químicas e deterioração por microrganismos. Estes contaminantes podem causar modificações físico-químicas e sensoriais, que limitam a durabilidade do leite e seus derivados, além de problemas econômicos e de saúde pública.

Uma preocupação primária da indústria de laticínios está relacionada à deterioração dos produtos lácteos causada por microrganismos indesejáveis e patógenos que são

introduzidos no leite e nos produtos lácteos associados às práticas de produção insatisfatórias, falhas no sistema de processamento ou higiene inadequada.

Ao contrário do que ocorre com outros microrganismos, os microrganismos patogênicos que causam doenças nem sempre causam deterioração do alimento, o que dificulta o reconhecimento de um alimento potencialmente perigoso para o consumo humano. Esses microrganismos podem atingir o alimento na produção, durante o processamento ou durante o preparo, principalmente quando este é manipulado e conservado inadequadamente até o momento do consumo, ou reservado para o consumo tardio. Alimentos crus são potenciais fontes de patógenos e podem contaminar utensílios de cozinha pelo simples contato, transformando equipamentos e superfícies em importantes fontes de contaminação.

E. coli O157:H7 é uma bactéria patogênica, cujas doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são classificadas pela “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF) no grupo de risco IA, que inclui as doenças “de severo perigo para a população em geral, representando risco de morte, seqüelas crônicas ou longa duração”.

Material fecal é uma fonte de *E. coli* O157:H7 em produtos lácteos. Portanto, o consumo de alimentos crus ou mal cozidos de origem bovina, particularmente hambúrguer e leite não-pasteurizado, é a causa mais comum de transmissão de *E. coli* O157:H7.

O presente trabalho teve por objetivo traçar um perfil de propriedades produtoras de leite em Viçosa e 4 municípios limítrofes, quanto a presença de coliformes termotolerantes e *E. coli* O157, e verificar onde ocorre maior prevalência destes microrganismos no ambiente de criação de gado leiteiro por meio da análise de leite, fezes, úbere, ração, água, utensílios, equipamentos e ordenhador.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Produção e Consumo de Leite no Brasil

Dados epidemiológicos acerca de toxinfecções alimentares são praticamente inexistentes no Brasil (FRANCO et al, 2003), inclusive em relação a leite e derivados. Entretanto, a produção leiteira no país vem ganhando bastante destaque no comércio interno, com dados bastante consistentes.

Atualmente o país possui uma posição de destaque no cenário mundial de produção de leite (Tabela 1), apesar da produtividade de seu rebanho leiteiro ser relativamente baixa (Tabela 2). A produção leiteira brasileira é alta em função do tamanho do rebanho, fazendo com que o país ocupe o sexto lugar no “ranking” mundial (Tabela 1). A baixa produtividade nada mais é do que um reflexo de problemas no início da cadeia produtiva do leite, uma vez que se sabe que vários fatores afetam a baixa produção de animais em lactação: manejo inadequado, nutrição deficiente, pouca ou nenhuma seleção genética, pouco controle de sanidade animal. No Brasil, uma importante causa da baixa produção leiteira é a alta ocorrência de mastites subclínicas, que raramente são diagnosticadas ou controladas (Fonseca e Santos, 2000). Sabe-se que essas doenças determinam uma queda na produção leiteira, além de produção com baixa qualidade (URECH et al, 1999; ZANELA et al, 2004).

Tabela 1: Classificação mundial dos principais países produtores de leite - 2006

Posição	País	Produção de leite (mil ton.)	Percentual do	
			Total	Acumulado
1	Estados Unidos	82463	15,0	15,0
2	Índia	39775	7,2	22,2
3	China	32249	5,7	27,9
4	Rússia	31074	5,7	33,6
5	Alemanha	28453	5,2	38,8
6	Brasil	25333	4,6	43,4
7	França	24195	4,4	47,8
8	Reino Unido	14577	2,7	50,5
9	Nova Zelândia	14498	2,6	53,1
10	Ucrânia	12988	2,4	55,5

Fonte: EMBRAPA, 2007

Tabela 2: Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados, 2005.

Posição	País	Produção de leite (mil ton)	Vacas ordenhadas (mil cabeças)	Produtividade (litros/vacas/ano)
1	Estados Unidos	80150	9025	8881
2	Canadá	8100	1066	7598
3	Países Baixos	10532	1471	7160
4	Reino Unido	14577	2090	6975
5	França	25282	3861	6548
6	Alemanha	27600	4286	6440
7	Itália	10500	1913	5489
8	Austrália	10150	2040	4975
9	Polônia	12400	2730	4542
10	Argentina	8100	2000	4050
17	Brasil	25000	20500	1219
18	Índia	38500	38500	1000

Fonte: EMBRAPA, 2007

As razões para determinados países apresentarem baixa produtividade devem-se a características próprias de cada nação. No Brasil, por exemplo, a produção leiteira é caracterizada por pequenos a médios produtores, com produção média diária de 50 litros a 100 litros. Em geral essas propriedades são comandadas por famílias, que utilizam essa atividade como a principal fonte de renda. Em alguns casos ocorre pouco investimento na produção leiteira, gerando pouca produtividade e baixa qualidade do produto final, já que uma parcela muito pequena desses produtores tem acesso à tecnologia e assistência adequadas na produção. Isso é refletido na qualidade do leite, sendo possível verificar com relativa frequência que propriedades com maior produção leiteira, comparadas àquelas com menor produção, produzem leite de melhor qualidade (TKAEZ et al, 2004). Embora a produtividade do rebanho leiteiro brasileiro seja relativamente baixa, vem ocorrendo um gradativo crescimento desse parâmetro no decorrer dos últimos dez anos (Figura 1), indicando que apesar de lenta, a melhoria da produção vem ocorrendo.

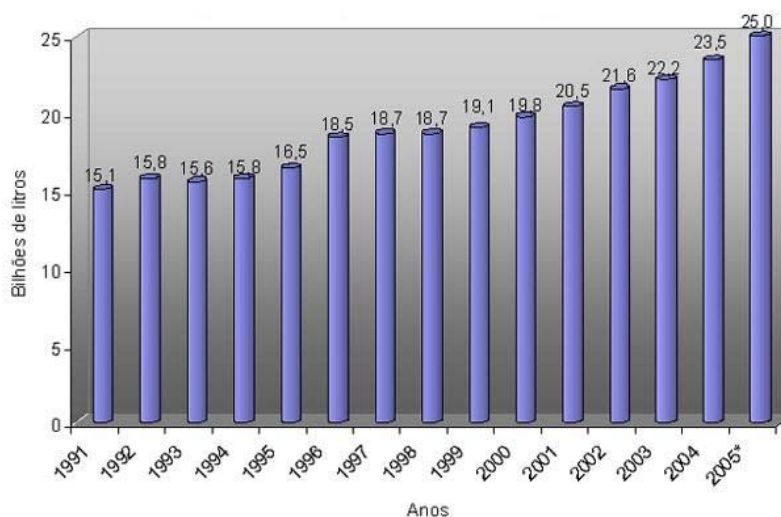


Figura 1: Evolução da produtividade da produção leiteira no Brasil (litros/vaca/ano) entre os anos de 1991 e 2005 (Fonte: EMBRAPA, 2007).

No Brasil, os diferentes Estados apresentam uma grande variação em relação à quantidade e produtividade leiteira. A Figura 2 mostra a evolução da produção leiteira nos cinco maiores Estados produtores, entre os anos de 1992 e 2002. Apesar de ser o maior

produtor, o Estado de Minas Gerais é apenas o sexto em produtividade, assim como ocorre com Goiás, o segundo maior produtor e oitavo em produtividade. O Estado do Rio Grande do Sul apresenta a maior produtividade leiteira, o que indica que nesse Estado há um controle mais eficiente da produção e da sanidade animal. Outros Estados apresentam um desenvolvimento evidente da produtividade leiteira, como Rondônia, com um crescimento de 88,74 % da produção entre os anos de 1991 e 2001, Pará (87,75 %) e Mato Grosso (85,17 %) (IBGE, 2005). As diferenças observadas nos Estados brasileiros em relação à produção de leite devem-se a características próprias de cada região, como perfil do produtor, maior acesso à assistência técnica, programas regionais de controle sanitário de rebanhos, laticínios com políticas sérias de pagamento e controle de qualidade. Todos esses fatores podem exercer influência na decisão do produtor em investir e progredir na atividade leiteira.

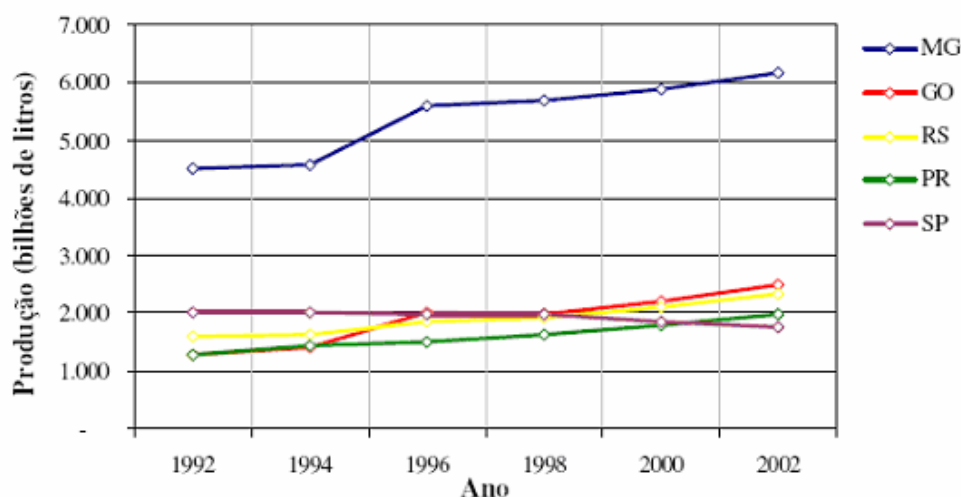


Figura 2: Evolução nos cinco Estados brasileiros com maior produção leiteira entre os anos de 1992 e 2002 (Fonte: IBGE, 2005).

Na produção leiteira brasileira são observados basicamente três tipos de ordenha: ordenha manual, com manipulação direta por “retireiros”, que fazem a higienização dos animais e retirada do leite, captado em baldes e posteriormente transferido para latões; ordenha em sistema semifechado, ou denominado “balde-ao-pé”, onde os animais são ordenhados por ordenhadeiras mecânicas, em sistema de vácuo, porém com o leite

direcionado para latões de cerca de 50 litros; e por fim, ordenha em sistema fechado, comum em granjas leiteiras, com ordenha realizada por um sistema de vácuo, onde o leite é obtido por ordenhadeiras mecânicas e transferido, por tubulações de aço inoxidável, para um grande tanque resfriador, sem ocorrer qualquer tipo de manipulação (FONSECA e SANTOS, 2000).

Apesar dos atuais esforços do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Brasil nem toda produção leiteira é armazenada em resfriadores, porque a aquisição desses equipamentos representa um alto custo para pequenos e médios produtores. Nesses casos, algumas adaptações são permitidas e observadas, como o investimento de vários produtores em um único resfriador de grande capacidade, tornando-o “comunitário”, e adaptação de tanques de água com sistemas de refrigeração, onde são armazenados latões com a produção das propriedades, denominados tanques de imersão (BRASIL, 2002). Apesar de resfriarem o leite, essas práticas são alternativas marginais e não ideais, como o caso dos tanques de imersão, nos quais a refrigeração pode ser inadequada, diminuindo a qualidade do produto. Mesmo com essas alternativas em relação à refrigeração, ainda é bastante comum os produtores simplesmente não resfriarem a produção; após a coleta, os latões são deixados nas estradas próximas às propriedades para recolhimento por caminhões de laticínios.

Apesar do caráter familiar, típico da produção leiteira no Brasil, grande parte do leite é destinada ao beneficiamento, para fabricação de leite fluido e derivados, e o restante é destinado à exportação (IBGE, 2005). Porém, tanto em pequenas cidades (comunidades tipicamente rurais) como em grandes centros, ainda é comum a comercialização do chamado leite cru, atualmente denominado informal, mesmo sendo proibida por lei desde 1952 (BRASIL, 1952), além de consumo desse tipo de leite. De acordo com o IBGE, entre 35,6 % e 42 % do leite produzido no Brasil não foi inspecionado por qualquer autoridade de inspeção federal, estadual ou municipal (Tabela 3). Como fatores que estimulam esse comércio, podem ser citadas principalmente as flutuações na economia, que obrigam o produtor a procurar formas alternativas de obter maior lucro com o leite e a necessidade de atender uma demanda de mercado desse produto, uma vez que existe um importante mercado consumidor que acredita que esse tipo de leite oferece maiores vantagens nutricionais que o beneficiado, além de outros supostos benefícios, como preço, fatores

emocionais, comodidade na entrega e pagamento (BELOTI et al, 1999; NERO et al, 2003). Segundo Enticott (2003), a preferência por alimentos crus, como o leite, se deve à atual procura do consumidor por alimentos “naturais”, “tradicionais” e locais, desconsiderando conhecidos conceitos de segurança alimentar.

Tabela 3: Leite produzido e inspecionado no Brasil (1998-2003), estimando-se a provável parcela destinada ao comércio informal, em bilhões de litros.

	Anos						Média
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	
Produzido	18964	19070	19767	20510	21644	23315	20545
Inspecionado	10995	11139	12108	13213	13223	13630	12385
Déficit	7969	7931	7659	7297	8421	9685	8160
%	42,02 %	41,59 %	38,75 %	35,58 %	38,91 %	41,54 %	39,72 %

Fonte: IBGE, 2005

O hábito de consumir leite cru ou derivados preparados com leite não beneficiado não ocorre somente no Brasil. Dados do Canadá, por exemplo, indicam que 1 % da população consome leite que não é submetido a nenhuma espécie de tratamento térmico, o que representa cerca de 270 mil pessoas. Segundo Todd e Harwig (1996), a relação entre casos de toxinfecção alimentar causada por leite cru por habitante no Canadá é de 1:14, o que representa um índice bastante significativo.

Considerando toda a produção leiteira do Brasil em 2002, estima-se que a maior parte, cerca de 33 %, foi destinada à produção de queijos, 19,3 % para leite longa vida, 16,4 % para leite em pó e apenas 6,8 % para leite pasteurizado (EMBRAPA, 2007). A produção de derivados ressalta a importância da qualidade da matéria-prima, uma vez que exerce influência direta no produto final.

1.2.2 A importância e a qualidade do leite

Considerando a importância do leite sob os aspectos nutricionais, econômicos, sociais e de saúde pública, a qualidade desse produto tem merecido a atenção de inúmeros

pesquisadores em todo o mundo. A higiene leiteira, ou seja, a produção de leite limpo e sadio tem por objetivo oferecer um produto com valor nutricional, de forma a não comprometer a saúde humana (GARCIA et al, 2000).

A qualidade do leite está principalmente associada a diversos fatores, como deficiências no manejo e higiene de ordenha, índices altos de mastites, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou até inexistente e mão-de-obra desqualificada, entre outros (MACEDO e JÚNIOR, 2005).

Leite fresco ordenhado de vacas saudáveis normalmente contém um baixo grau de contaminação microbiana, menos que $1000.\text{mL}^{-1}$, mas esse grau pode aumentar 100 vezes ou mais uma vez que o leite é armazenado por algum tempo em temperatura ambiente (RICHTER e VEDAMUTHU, 2001). Entretanto, manter o leite em recipientes limpos em temperaturas refrigeradas, imediatamente após o processo de ordenha pode retardar o aumento da população microbiana inicial e prevenir a multiplicação de microrganismos no leite entre a ordenha na fazenda e o transporte para a unidade de processamento (BONFOH et al, 2003).

A contaminação do leite inicia-se na fazenda, durante ou após a ordenha, em função da ineficiência de higienização de utensílios e do homem, além de doenças do rebanho. Não se deve esquecer que as dificuldades de transporte, falhas no processo de beneficiamento e a estocagem podem interferir diretamente sobre a qualidade do leite. Dessa forma, para que seja mantida a qualidade do leite, é preciso produzi-lo, pasteurizá-lo e comercializá-lo de maneira correta, de acordo com as recomendações técnicas estabelecidas pela legislação. Nos últimos anos, um número crescente de laticínios e cooperativas têm remunerado o produtor de leite de acordo com a qualidade da matéria-prima fornecida para a indústria (GARCIA et al, 2000; FRANCO e LANDGRAF, 2005).

O comércio informal de leite é uma grande ameaça à saúde pública. Segundo a Organização Mundial de saúde (OMS), dezesseis doenças bacterianas e sete viróticas são veiculadas pelo produto comercializado nessas condições, dentre elas, tuberculose e gastroenterites, conseqüentes da baixa qualidade do leite (AGNESE, 2002).

1.2.3 Qualidade microbiológica do leite produzido no Brasil

O leite é um alimento nutritivo para seres humanos, mas também serve como um meio para o crescimento de muitos microrganismos, especialmente bactérias patogênicas (CHYE et al, 2004). A detecção de bactéria coliformes e patógenos no leite indicam uma possível contaminação do úbere, utensílios e água utilizada (BONFOH et al, 2003).

O tipo de produção que ocorre na maioria das propriedades leiteiras no Brasil, com pouca tecnologia, controle sanitário dos animais e higienização deficientes, gera leite de baixa qualidade. Um dos principais aspectos de qualidade afetados é a qualidade microbiológica, uma vez que o leite produzido em condições inadequadas de higiene e sanidade possui alta população bacteriana, comprometendo-o do ponto de vista tecnológico, de durabilidade e de segurança alimentar. O leite com baixa qualidade microbiológica gera a fabricação de derivados e de leite beneficiado, pasteurizado ou UAT de semelhante baixa qualidade, o que revela a importância da produção de matéria-prima com qualidade (NERO, 2005).

A qualidade microbiológica do leite cru produzido em várias regiões do país é bem conhecida (FRANCO et al, 2000; LOURENÇO e SILVA, 2000; BUENO et al, 2002; VIANA et al, 2002; BELMONTE e LAGO, 2004; PONSANO et al, 2004), predominando as altas contagens de aeróbios mesófilos e de coliformes, que são indicativas de contaminação durante o processamento e armazenamento. Também é relatada a presença de microrganismos psicrófilos, que são deteriorantes e produtores de enzimas que comprometem a qualidade dos produtos finais, após o processamento (GUIMARÃES, 2002; BRUM et al, 2004). Estes microrganismos, que são incorporados ao leite em função da higienização deficiente em etapas da produção e durante o armazenamento em temperaturas de refrigeração não controladas, têm a oportunidade de multiplicarem-se e causarem deterioração no leite (BELOTI et al, 2002; VERAS et al, 2002). Também é relatada frequentemente a presença de coliformes totais e termotolerantes, sendo estes últimos originados de matéria fecal e podem estar presentes também no ambiente e contaminar o leite. Os coliformes, além de serem indicadores de higiene de produção, também podem produzir uma série de enzimas que comprometem a qualidade dos derivados a que o leite cru é destinado.

Com uma matéria-prima com esse perfil microbiológico, o beneficiamento desse produto dificilmente gera uma melhoria significativa desse parâmetro de qualidade. Assim, no Brasil é comum observar a comercialização de leite pasteurizado com baixa qualidade microbiológica, independente do tipo. Além dos problemas mencionados em relação ao leite cru, que se mantêm no produto beneficiado, muitas vezes detecta-se um beneficiamento ineficiente, sem a redução satisfatória dos microrganismos deteriorantes e patogênicos (BELOTI et al, 1997; CARLOS et al, 2004), além de muitas vezes ser relatada contaminação após o processo de pasteurização, que resultam em baixa qualidade do produto final (CARVALHO et al, 2004; MONTEIRO et al, 2004).

Esses problemas em relação à qualidade do leite cru geram vários problemas na indústria, como baixo rendimento na fabricação de queijos, pouca durabilidade do leite pasteurizado, problemas tecnológicos em leites esterilizados, além de sérios perigos à saúde pública, como a presença de patógenos (PEREIRA et al, 2001; SILVA et al, 2001) e ocorrência de alergias em consumidores associada a resíduos de substâncias químicas, como antibióticos e pesticidas (NASCIMENTO et al, 2001; BARREIRA et al, 2004; CARLOS et al, 2004; FARIAS et al, 2004; KOIDE e GIROTO, 2004; LEME et al, 2004).

1.2.4 Instrução Normativa nº 51

Considerando as evidências da baixa qualidade do leite produzido e consumido no Brasil (FRANCO et al, 2000; LOURENÇO et al, 2000; PEREIRA et al, 2001; BELOTI et al, 2002), o MAPA iniciou há cerca de 10 anos uma discussão nacional, envolvendo os setores científicos e econômicos da área leiteira, buscando alternativas para alterar esse panorama. Essa discussão resultou na Portaria Nº 166 (BRASIL, 1998), que estabeleceu um grupo de trabalho para analisar e propor um programa de medidas visando o aumento da competitividade e a modernização do setor leiteiro no Brasil. Esse grupo desenvolveu uma versão do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), projeto que já vinha sendo desenvolvido desde 1996, e o submeteu à consulta pública pela Portaria Nº 56 (BRASIL, 1999). A versão definitiva das novas normas de produção leiteira foi publicada na Instrução Normativa Nº 51 (IN51), de 18 de setembro de 2002, que determina novas normas na produção, identidade e qualidade de leites tipos A, B, C, pasteurizado e cru

refrigerados, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel (BRASIL, 2002). Outro incentivo à modernização da produção leiteira no Brasil ocorreu em 2003, pela Resolução N° 3088 (BRASIL, 2003), que aprovou financiamento de equipamentos de resfriamento e coleta a granel para produtores de leite. A principal razão de todas essas medidas foi a necessidade de adequação das normas publicadas no RIISPOA (BRASIL, 1952) às atuais realidades de produção e consumo de leite no Brasil.

Dentre as modificações preconizadas pela IN51, pode ser citada a permissão de comercialização de leites pasteurizados tipos A e B com diferentes percentagens de gordura (integral, padronizado, semidesnatado e desnatado), visando atender um mercado consumidor exigente. Entretanto, uma das principais alterações diz respeito ao leite tipo C; até então, o leite cru destinado ao beneficiamento desse tipo de leite pasteurizado não possuía padrões microbiológicos de qualidade. De acordo com as novas normas, esse leite passou a ser denominado “leite cru refrigerado” e deve ser refrigerado ainda na propriedade, além de possuir uma contagem de aeróbios mesófilos máxima de $1,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, objetivo a ser atingido em diferentes prazos de acordo com a localização geográfica da região produtora (Tabela 4).

Tabela 4: Requisitos microbiológicos para leite cru refrigerado a serem atingidos em diferentes regiões do Brasil.

Regiões	até 01/07/2005	de 01/07/2005 até 01/07/2008	de 01/07/2008 até 01/07/2011	a partir de 01/07/2011
Sul, Sudeste e Centro-Oeste				
Regiões	até 01/07/2007	de 01/07/2007 até 01/07/2010	de 01/07/2010 até 01/07/2012	a partir de 01/07/2012
Norte e Nordeste				
Contagem Padrão em Placas	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$ (individual) $3,0 \times 10^5$ (conjunto)
Contagem de Células Somáticas	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

Fonte: Brasil, 2002

O “leite pasteurizado tipo C” foi extinto em datas determinadas, variáveis de acordo com a localização geográfica da região produtora (01/07/2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e 07/07/2007 nas regiões Nordeste e Norte). A partir daí, destinou-se o leite

cru refrigerado com os novos padrões de qualidade ao beneficiamento de leite pasteurizado, que também possui novos padrões de qualidade (BRASIL, 2002).

Outra importante norma descrita na IN51 é a regulamentação de conservação, coleta e transporte de leite cru refrigerado, independente do tipo, que deve ser feita a granel. Nas propriedades, o leite cru deve ser refrigerado e atingir a temperatura de 4 °C em tanques de expansão ou 7 °C em tanques de imersão, num período não superior a 3 horas após o término da ordenha. A permissão da utilização de tanques de imersão está sendo considerada como uma medida provisória, para pequenos produtores poderem se adequar às exigências de conservação. Uma alternativa para esses produtores é a adoção de tanques resfriadores comunitários, prevista pela IN51 e que visa atender pequenos produtores. A coleta a granel é realizada por caminhões-tanque, que coletam o leite refrigerado nas propriedades e o encaminham, em compartimentos isotérmicos, a laticínios para processamento. Na recepção dos laticínios, o leite desses tanques não deve apresentar temperatura superior a 10 °C, independente do tipo.

A redução da contagem de células somáticas (CCS) também é um importante objetivo a ser alcançado, em prazos similares aos estabelecidos para contagem de aeróbios mesófilos (Tabela 5). Todas essas normas representam um importante passo do PNMQL, que busca a melhoria da qualidade do leite cru produzido no Brasil, resultando num produto final beneficiado de melhor qualidade (GUIMARÃES, 2002).

Estes novos critérios de qualidade representam um importante auxílio na tentativa de se melhorar a qualidade do leite produzido e consumido no Brasil.

1.2.5 Microbiota do leite cru

Os números e tipos de microrganismos presentes no leite imediatamente após a produção, por exemplo, a microbiota inicial, refletem diretamente a contaminação durante a produção, coleta e manipulação. A microbiota do leite, quando este deixa a fazenda, é significativamente influenciada pela temperatura de armazenamento e pelo tempo decorrido após a coleta. Quando o leite é armazenado em temperatura ≤ 4 °C, a multiplicação bacteriana é normalmente atrasada por no mínimo 24 horas. A microbiota, portanto, é similar àquela presente inicialmente. Entretanto, se existem condições insatisfatórias com o

equipamento de ordenha ou tanque de armazenamento, as baixas temperaturas podem mascarar essas condições (CHAMBERS, 2002).

O leite, mesmo ordenhado assepticamente de úberes saudáveis, não é estéril, pois contém microrganismos como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* ssp., *Escherichia coli* e outros. Algumas partes do úbere podem produzir leite livre de bactérias associadas a efeitos antimicrobianos inerentes como presença de queratina nos dutos. A recontaminação é, contudo, possível em função da limpeza e desinfecção insuficientes na parte exterior do úbere ou devido à penetração dos microrganismos nos dutos (RICHTER e VEDAMUTHU, 2001).

Condições anormais associadas à infecção, doenças ou práticas inadequadas de ordenha podem afetar a microbiota do leite retirado do úbere. Vacas com mastite, uma doença inflamatória do tecido mamário, podem espalhar altos números de microrganismos e células somáticas diretamente no leite. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *E. coli* e *Actinomyces pyogenes* são os microrganismos mais frequentemente envolvidos em mastite. Uma vez que vacas infectadas com *S. uberis* ou com *E. coli* podem desprender acima de 10^7 UFC.mL⁻¹ (LEIGH, 1999) e 10^8 UFC.mL⁻¹ (VAN WERVEN et al, 1997) respectivamente, uma vaca infectada pode influenciar o número total de bactérias no volume do tanque de leite. Embora a microbiota de um úbere saudável possa estar presente no leite cru, esses organismos não causam aumentos significativos na contagem bacteriana total do volume do tanque. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, coliformes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Corynebacterium bovis* têm também sido relatados. A presença de *Salmonella*, *Campylobacter* ssp., *Yersinia enterocolitica* e *E. coli* resultam preferivelmente da contaminação fecal do que da excreção através da glândula mamária. Essa contaminação ocasional em baixas concentrações é difícil de ser eliminada, até mesmo sob condições higiênicas de ordenha (RICHTER e VEDAMUTHU, 2001).

Bactérias do gênero *Clostridium*, *Bacillus* e da família *Enterobacteriaceae* provenientes de materiais como terra, forragens, resíduos de alimentos e adubo estão presentes na superfície do úbere, tetas e pele da vaca. A contribuição dos microrganismos destas fontes no leite fresco ordenhado pode variar de algumas centenas a vários milhares por mililitro, dependendo do cuidado na limpeza e desinfecção da superfície do animal

antes da ordenha. Os gêneros formadores de esporos mais relevantes para leite e produtos lácteos são *Bacillus* e *Clostridium*. *Bacillus* spp. é implicado na deterioração de leites cru e pasteurizado, leite UAT e produtos lácteos concentrados e enlatados. *Clostridium* spp. É associado à deterioração por rancidez de numerosos queijos (HAYES e BOOR, 2001).

Bactérias termodúricas pertencentes a diversos gêneros também são isoladas de leite, incluindo *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Alcaligenes* (HAYES e BOOR, 2001). *Microbacterium lacticum* e esporos bacterianos normalmente apresentam 100 % de sobrevivência à pasteurização; alguns *Micrococcus* spp. são um pouco menos resistentes; e somente 1 % a 10 % das estirpes de *Alcaligenes tolerans* podem sobreviver. Espécies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium* são resistentes ao calor e sobrevivem por mais de 20 minutos a 60 °C, mas somente uma pequena percentagem da microbiota termodúrica, normalmente sobrevive a 63 °C por 30 minutos. A maioria das incidências de coliformes e *E. coli* encontrados em leite depois da pasteurização normalmente podem ser atribuídos a uma contaminação pós-pasteurização durante o armazenamento e/ou na etapa de enchimento (BRAMLEY e MCKINNON, 1990).

Micrococcus e *Microbacterium* spp. são oriundos quase exclusivamente dos equipamentos de ordenha, que algumas vezes se apresentam tão contaminados com essas bactérias, mais provavelmente provenientes de biofilmes que a contagem de termodúricos no leite freqüentemente excede 5×10^4 UFC.mL⁻¹. A maioria dos termodúricos não se multiplica bem no leite cru, mesmo em temperatura ambiente, além disso, uma alta contagem de termodúricos no leite exibido em 24 horas seria uma evidência segura de contaminação cruzada proveniente dos equipamentos de ordenha (CHAMBERS, 2002).

Dentre a microbiota psicrotrófica, os de ocorrências mais comuns no leite são: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Serratia* e *Alcaligenes*, com *Pseudomonas fluorescens* predominando; outras espécies incluem *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Flavobacteriu*, *Acinetobacter-Moraxella*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Aeromona*, *Klebsiella* e o grupo coliforme compreendem a maioria dos psicrotróficos restantes. Alguns gêneros de bactérias isoladas do leite são ambos, psicrotróficos e termodúricos, incluindo *Bacillus* Gram-positivos, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Corynebacterium*. O crescimento desses psicrotróficos no leite é

acompanhado da produção de lipases e proteinases termoestáveis que contribuem para o desenvolvimento de um “flavor” rançoso. Os organismos psicrotróficos Gram-negativos são destruídos pela pasteurização, mas suas enzimas permanecem ativas. Como conseqüência, esses organismos são de importância considerável na manufatura de produtos lácteos e estão mais comumente associados a uma contaminação pós-pasteurização (COUSIN, 1982).

A incidência de linhagens psicrotróficas de *Bacillus* spp. na sua forma esporulada em leite oriundo de produtores individuais é baixa, raramente excede 10 UFC.mL⁻¹. As espécies encontradas no leite cru incluem *B. coagulans*, *B. circularis*, *B. cereus*, *B. pumilus* e *B. subtilis*. *Arthrobacter* e outras espécies Gram-positivas, por exemplo, *Streptococcus* também têm sido associadas à microbiota psicrotrófica de leite cru. Limpeza e desinfecção inadequadas dos equipamentos de ordenha ainda são as principais razões para a presença de alguns psicrotróficos no leite cru (COUSIN, 1982).

A incidência de coliformes pertencentes ao gênero *Enterobacter* e *E. coli* no leite cru tem recebido considerável atenção. Isto se deve a sua associação com a contaminação de origem fecal e o conseqüente risco de que outros patógenos de origem fecal estejam presentes e, parcialmente, em função da deterioração que pode ser produzida no leite mantido à temperatura ambiente (CHAMBERS, 2002).

A presença de coliformes no leite cru não é evidência de contaminação fecal direta e não deve ser confiável para detectar limpeza inadequada do úbere antes da ordenha. Os coliformes podem crescer rapidamente em resíduos lácteos (biofilmes) úmidos, em equipamentos de ordenha e tornarem-se a maior fonte de contaminação do leite coletado. Entretanto, uma contagem relativamente baixa de coliformes no leite não indica necessariamente uma limpeza efetiva e desinfecção dos equipamentos. Uma contagem regular de coliformes acima de 100 UFC.mL⁻¹ é considerada por alguns sanitaristas evidência de práticas de produção insatisfatória, o que leva a uma contaminação ambiental do leite. Entretanto, uma contagem esporádica alta de coliformes pode ser relatada a uma condição de mastite no rebanho leiteiro (CHAMBERS, 2002).

Algumas espécies que constituem o grupo coliforme são bactérias psicrotróficas e constituem 10 % a 30 % da microbiota do leite cru isolada entre 5 °C e 7 °C. A maioria desses coliformes são *Aerobacter* spp.

A limpeza inadequada dos equipamentos deixa resíduos de leite, o que permite o desenvolvimento de microrganismos e a formação de biofilme. Descuidos ocasionais resultam em rápidos aumentos no crescimento de *Lactococcus*, coliformes e outros Gram-negativos como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Chromobacterium*. Estes microrganismos são termossensíveis e são rapidamente eliminados por ação de desinfetantes clorados.

Na Tabela 5 são apresentados microrganismos com potencial patogênico para humanos que podem ser encontrados em leite cru (JOHNSON et al, 1990; FLOWERS et al, 1992).

Tabela 5: Patógenos microbianos para humanos associados com leite e produtos lácteos.

ORGANISMO	DOENÇA
<i>E. coli</i> , incluindo O157:H7	Gastroenterite, síndrome hemolítico urêmica
<i>Salmonella</i>	Gastroenterite, febre tifóide
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenterite
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gastroenterite
<i>Brucella spp.</i>	Brucelose
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterite
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gastroenterite
<i>Bacillus cereus</i>	Gastroenterite
<i>Bacillus anthracis</i>	Pústula maligna
<i>Clostridium perfringens</i>	Gastroenterite
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicação emética
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Ferida na garganta
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Febre
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Faringite
<i>Corynebacterium spp.</i>	Difteria
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriose
<i>Mycobacterium bovis</i>	Tuberculose
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose

<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Doença de Johne
<i>Coxiella burnetti</i>	Febre Q
Enterovirus	Infecção entérica
Vírus da hepatite	Hepatite infecciosa
Fungos filamentosos	Micotoxicose
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebíase
<i>Giárdia lamblia</i>	Giardiase
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose

Fonte: Adaptada de BOOR, 1997 e JOHNSON et al, 1990.

1.2.6 Microbiota do exterior de úberes e tetas

Uma ampla variedade de gêneros e espécies de microrganismos no ambiente da vaca pode estar presente na superfície das tetas e serão transmitidos para o leite e para os equipamentos de ordenha. Alguns podem se estabelecer se as condições forem favoráveis; outros podem ser somente contaminantes transientes. O leite cru, fresco pode inibir ou até mesmo inativar alguns dos microrganismos existente na superfície das tetas, então, mesmo presentes em números altos, podem não ser detectados (CHAMBERS, 2002).

As tetas frequentemente se tornam sujas com esterco, lama e materiais da cama, como, palha, serragem, lascas de madeira ou areia. Se não for removida antes da ordenha, esta sujeira, junto com o grande número de microrganismos associados a ela, será introduzida no leite. O número e tipo de microrganismos variam de acordo com o tipo e quantidade de sujeira presente nas tetas. (COUSIN, 1982).

O leite de vacas com tetas muito sujas com esterco pode ter uma contagem padrão em placas entre 10^5 UFC.teta⁻¹ a 10^7 UFC.teta⁻¹. Micrococos, incluindo estafilococos coagulase-negativa, estão entre os grupos predominantes presentes ($\sim 10^4$ UFC.teta⁻¹). Estreptococos, principalmente tipos fecais, também são numerosos, mas os bastonetes Gram-negativos, incluindo coliformes, são bem menos numerosos. A contagem de coliformes raramente excede 10^2 UFC.teta⁻¹. Parece que esses organismos, ao contrário dos micrococos, por exemplo, não sobrevivem bem sobre a pele das tetas, embora eles possam

constituir uma grande proporção da microbiota dos materiais da cama (CHAMBERS, 2002).

A microbiota psicrotrófica da superfície das tetas é constituída por um grupo de microrganismos pobremente definido, consistindo de coryneformes e bastonetes Gram-negativos, a maioria dos quais não se multiplicam rapidamente no leite cru (CHAMBERS, 2002).

Os organismos termodúricos aeróbios sobre a superfície das tetas são formados quase totalmente por esporos de *Bacillus*. A contagem de esporos pode alcançar de 10^2 .teta⁻¹ a 10^5 .teta⁻¹, dependendo das condições ambientais do solo. As espécies predominantes derivadas do solo são *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. firmus*, com *B. circulans* ocorrendo com menor frequência (MCKINNON e PETTIPHER, 1983).

Esporos de clostrídios são detectados em forragens, camas e fezes e seus números declinam marcadamente quando as vacas estão no pasto. Tais esporos (*Clostridium tyrobutyricum*) podem causar defeito na textura de queijos “Emmenthal” e “Gruyère”. Esta bactéria está associada a uma silagem ruim e pode ser transmitida via fezes, de vacas que alimentam de silagem, para tetas e, finalmente, para o leite, a não ser que as tetas sejam lavadas para retirada do material fecal (CHAMBERS, 2002).

Uma prática comum na produção leiteira é filtrar o leite com um tecido de algodão. Este processo remove somente grandes fragmentos, mas não remove partículas finas, como, bactérias e células somáticas. Além disso, a bactéria introduzida no leite pode passar através do filtro. Para minimizar a contaminação bacteriana da superfície das tetas, é essencial evitar que as tetas tornem-se muito sujas entre as ordenhas, lavar as tetas com água contendo desinfetantes e secar cuidadosamente as tetas antes de acoplar aos equipamentos de ordenha.

1.2.7 Fontes Ambientais

O ar não é considerado uma fonte significativa de contaminação microbiana no leite cru. Por meio de seu movimento, o ar transfere sujeiras e partículas de poeira de uma fonte carregada de microrganismos para dentro do leite exposto. A contagem bacteriana do ar no

estábulo raramente excede a 200 UFC.L⁻¹ e normalmente são muito menores. Micrococcos constituem mais de 50 % da microbiota do ar. Coryneformes, esporos de *Bacillus*, pequenas quantidades de estreptococos e bastonetes Gram-negativos também estão presentes e formam a microbiota restante. Pesquisas indicam que bactérias provenientes do ar somam < 5 UFC.mL⁻¹ no leite produzido e que esporos de *Bacillus* constituem < 1 UFC.mL⁻¹ (CHAMBERS, 2002).

A água usada na limpeza e desinfecção de equipamentos e utensílios constitui outra importante fonte de contaminação para o leite, pois em muitos casos a água da fazenda é oriunda de fontes não tratadas. Exemplos de bactérias fecais comuns encontradas na água são coliformes, estreptococos fecais e clostrídios (CHAMBERS, 2002).

Em adição, uma grande variedade de microrganismos saprófitos originados do solo ou de vegetação podem estar presentes, incluindo *Pseudomonas* spp., coliformes e outros bastonetes Gram-negativos, esporos de *Bacillus*, bactéria coryneforme e bactérias do ácido láctico.

O tanque de armazenamento da fazenda também pode ser uma via de contaminação microbiana do leite, pois muitas vezes não é protegido contra roedores, pássaros, insetos e poeira.

As pessoas que ordenham podem contaminar o leite com micrococcos e estafilococos oriundos da pele e das vias respiratórias superiores.

1.2.8 Microbiota dos equipamentos de ordenha

Quando devidamente limpos, desinfetados e drenados, os equipamentos de ordenha podem ser minimizados como fonte de contaminação no leite cru. Entretanto, limpeza e desinfecção inadequadas das superfícies de contato com o leite, incluindo latas e tanques, são consideradas as maiores fontes de bactérias depois de sua coleta do úbere.

As vacas normalmente são ordenhadas duas vezes ao dia, e os equipamentos devem ser limpos após cada ordenha. Considerando a complexidade da máquina de ordenha e alguns de seus componentes, os resíduos de leite e as bactérias associadas podem não ser completamente removidos do equipamento e tendem a acumular ao longo do tempo formando biofilmes. Descuidos ocasionais resultam em rápidos aumentos no crescimento

de *Lactococcus*, coliformes e outros Gram-negativos como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Chromobacterium*. Estes microrganismos são termossensíveis e são rapidamente inativados por desinfetantes clorados.

De um modo geral, os grupos e gêneros de microrganismos encontrados nas superfícies de contato com o leite são similares àqueles encontrados no leite cru fresco. Entretanto, ao serem isolados de equipamentos limpos, as colônias devem crescer sobre placas contendo meio de cultura para contagem padrão, e tipos específicos de microrganismos podem estar presentes em proporções apreciáveis, superiores a > 5 %. A sobrevivência da bactéria sugere que há alguma proteção durante os procedimentos de limpeza e desinfecção, e subseqüentemente, as bactérias são capazes de se proliferarem durante o tempo decorrido entre as ordenhas (CHAMBERS, 2002).

Certas espécies, principalmente patógenos oriundos de vacas com mastite, não são considerados como parte apreciável da microbiota dos equipamentos de ordenha, embora números grandes de estreptococos e estafilococos possam estar presentes no leite passando por meio do contato com equipamentos. Os microrganismos podem sobreviver por um tempo suficientemente longo e serem transferidos de vacas com quartos infectados para vacas com quartos não infectados. Esses organismos também podem ser transferidos para outras vacas via tecidos utilizados na limpeza do úbere e mãos dos manipuladores. Entretanto, eles provavelmente não se multiplicam nas superfícies dos equipamentos entre as ordenhas (BRAMLEY e DODD, 1984).

As temperaturas das soluções usadas para a limpeza e desinfecção podem influenciar a microbiota remanescente nas superfícies de contato com o leite. A tubulação das máquinas de ordenha é pasteurizada e, portanto, somente microrganismos termodúricos podem sobreviver. A aplicação de soluções de detergente a 70 °C tem efeito similar. Na prática, as temperaturas de pasteurização não são sempre atingidas, tipos microbianos com alta resistência ao calor, como bastonetes Gram-positivos, provavelmente, *Microbacterium* spp., micrococos, estreptococos e *Bacillus* spp. normalmente dominam após o tratamento de limpeza a quente (CHAMBERS, 2002).

O uso de soluções em baixas temperaturas, 40 °C a 50 °C permite o desenvolvimento de uma microbiota heterogênea. Entretanto, em muitas tubulações, investigações mostram que a microbiota é restrita com um ou dois dos seguintes grupos

predominando: micrococos, estreptococos, bastonetes Gram-negativos e bastonetes Gram-positivos. Em qualquer máquina de ordenha, a microbiota pode ser consistente ou pode variar de tempos em tempos.

Em um estudo realizado por Mackenzie (1973) sobre a contagem bacteriana de termodúricos e psicrotróficos nos equipamentos de ordenha foi constatado que a incidência de organismos termodúricos na tubulação das máquinas foi um pouco menor que os psicrotróficos. Nenhuma contagem de termodúricos excedeu 1×10^7 UFC.m⁻², enquanto 7,5 % dos sistemas analisados demonstraram contagem de psicrotróficos acima deste número.

1.2.9 Surtos de toxinfecção alimentar

Todos os anos nos EUA, as enfermidades transmitidas por alimentos geram milhões de doentes e milhares de mortes, sendo que a maioria não é diagnosticada ou relatada (JONES e GERBER, 2001; ANDERSON et al, 2004; FRENZEN, 2004;). Ao extrapolar os dados desse país para o resto do mundo, estima-se que um terço da população de países desenvolvidos é afetada anualmente por doenças de origem alimentar, acreditando-se que esse problema seja ainda maior em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (SCHLUNDT, 2002; Jay, 2005). No Brasil não existem dados oficiais que revelem a real situação das toxinfecções alimentares no país (FRANCO et al, 2003). Pesquisas revelam a presença de patógenos em vários alimentos estudados, porém a descrição de surtos e casos raramente é documentada (SILVA et al, 2000; PEREIRA et al, 2001; SILVA et al, 2001). Entretanto, as Secretarias de Saúde de alguns Estados brasileiros realizam investigações epidemiológicas mais aprofundadas, buscando descobrir as causas dos surtos de toxinfecções alimentares notificados, e a partir destes dados é possível estabelecer parâmetros que servem de apoio para resolução e prevenção do problema.

Cerca de 250 doenças diferentes podem ser veiculadas ao homem por ingestão de alimentos contaminados (CDC, 2007). Apesar da evolução dos conhecimentos sobre os microrganismos, dos mecanismos de intoxicações e das técnicas de higienização, tem-se observado ainda a ocorrência de um número alto de surtos e casos de doenças de origem alimentar. Isto se deve, principalmente, a eventuais alterações nos métodos de

processamento de alimentos que resultam em menor controle microbiológico e a comercialização de grande número de alimentos pronto para o consumo.

A importância de vários agentes etiológicos em doenças causadas pelo consumo de leite contaminado tem mudado ao longo do tempo. Entretanto, mais que 90 % de todos os casos relatados dessas doenças continuam sendo de origem bacteriana, com no mínimo 21 doenças relacionadas ao consumo de leite atualmente sendo reconhecidas (BEAN et al, 1996). Patógenos que são envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares associados com o consumo de leite incluem *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* e algumas espécies patogênicas de *Escherichia coli*. A presença dessas bactérias patogênicas em leite emergiu como maior preocupação de saúde pública, especialmente para aqueles indivíduos que ainda consomem leite cru (RYSER, 1998). Mais recentemente *Escherichia coli* O157:H7 tornou-se uma séria ameaça a indústria de laticínios com muitos surtos relatados em países desenvolvidos causando desde uma diarreia branda à Síndrome hemolítico urêmica (HUS) potencialmente fatal, colite hemorrágica e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (WELLS et al, 1991; BLEEM, 1994; COIA et al, 2001).

Embora tenha sido relatada a presença de *E. coli* O157:H7 em cidra de maçã, alface, broto de alfafa e leite de cabra (ACKERS et al, 1998), a maioria dos surtos de toxinfecções alimentares causados por *E. coli* O157:H7 são associados com o consumo de alimentos originados de gado, principalmente alimentos contaminados com fezes de gado. Uma vez que a *E. coli* O157 é encontrada regularmente em fezes de gados saudáveis (MEAD e GRIFFIN, 1998), este animal é conhecido como um transmissor assintomático (ZHAO et al, 1995; WANG et al, 1997; HEUVELINK et al, 1998).

Nos últimos 20 anos, muitas pessoas têm sido infectadas por este organismo, razão pela qual o interesse nesta bactéria tem aumentado. Por isso, muitas investigações sobre as diferentes propriedades e disponibilidade deste organismo em diferentes alimentos têm sido realizadas. O risco de infecção é alto porque a dose infecciosa de *E. coli* O157:H7 é tão baixa quanto 10 UFC.g^{-1} a 20 UFC.g^{-1} (BOLTON et al, 1996) ou 1 UFC.g^{-1} a 700 UFC.g^{-1} (TILDEN et al, 1996).

Desde que o gado leiteiro é carreador assintomático (ZHAO et al, 1995; WANG et al, 1997; HEUVELINK et al, 1998) de *Escherichia coli* O157:H7, produtos originados de

carne e leite são considerados os alimentos de maior risco do ponto de vista deste organismo. Além disso, um tratamento térmico insuficiente da carne e do leite cru produz um risco potencial de infecção (BETTS, 2000). As condições de processamento para diferentes produtos lácteos são muito importantes do ponto de vista do risco de infecção. Embora esse microrganismo possa ser inativado pela pasteurização, a taxa de sobrevivência em outros processos é alta, podendo por exemplo, tolerar 8,5 % de sal (GLASS et al, 1992). Queijo feito com leite não pasteurizado é um veículo potencial para a transmissão de *E. coli* O157 ao consumidor (OKSUZ et al, 2004).

No Brasil, a primeira estirpe de *E. coli* O157:H7 foi isolada e identificada em Parelheiros, no município de São Paulo, a partir de uma amostra de água de poço em uma chácara, não tendo sido ainda identificada em material humano (EDUARDO et al, 2002). Há o registro de *E. coli* O157:H7 em 1992 em um paciente aidético, onde não foi possível estabelecer relação com alimentos ou origem da infecção. Não há dados sistemáticos sobre a *E. coli* O157:H7 no Brasil e nem sobre a HUS (SILVA et al, 2003). Um estudo vem sendo conduzido no Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL) para conhecer a situação do patógeno e da síndrome e estabelecer pontos de referência para a implantação de um sistema adequado de vigilância e prevenção (EDUARDO et al, 2002). Da avaliação de diagnósticos registrados pela AIH/DATASUS/MS, no período de 1998 a julho de 2000, no Estado de São Paulo, 12 casos foram de HUS, com histórico anterior de diarreia e de possível associação com a *E. coli* O157. Na Universidade Federal de Santa Maria, no Rio Grande do Sul, um estudo retrospectivo de casos de HUS ocorridos no Hospital Universitário, no período de março de 1987 a agosto de 1999 apontou a existência de 25 casos da doença em crianças, com idade entre 2 meses a 57 meses (BARCELOS et al, 2000).

Vários fatores devem ser considerados em relação aos riscos que os microrganismos patogênicos podem representar à saúde pública, entre eles sua virulência, forma de transmissão e a susceptibilidade do hospedeiro, ou seja, do consumidor. Por exemplo, pacientes com AIDS apresentam um claro aumento da suscetibilidade a infecções por *Salmonella*, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*, com maior frequência de septicemias. Outros exemplos ainda podem ser citados, como pacientes com câncer que apresentam maior risco a septicemias por *L. monocytogenes*, idosos que são mais suscetíveis a diarreias causadas

por *Salmonella* e *Campylobacter*, e berçários, onde *E. coli* O157:H7 pode ser mais comum. Não deve ser desprezado também o aspecto nutricional do hospedeiro, que quanto pior a nutrição, maior a suscetibilidade a infecções dessa natureza (SCHLUNDT, 2002; MCLAUHLIN et al, 2004).

Surtos recentes de toxinfecções alimentares associados com leite e produtos lácteos revelaram que queijos, particularmente feitos de leite não pasteurizado ou leite imprópriamente pasteurizado são as principais fontes de salmonelose e, possivelmente, infecções causadas por *E. coli* (MENG e DOYLE, 1998).

A frequência de surtos provocados por microrganismos patogênicos presentes em leite e derivados enfatiza a necessidade de um controle eficiente da contaminação na produção leiteira, desde sua produção até o seu beneficiamento nos laticínios (STEELE et al, 1997).

A estratégia geral de prevenção dessas enfermidades transmitidas por alimentos tem como base a compreensão dos mecanismos pelos quais os microrganismos patogênicos envolvidos são transmitidos e nas formas de prevenir essa contaminação. Vários progressos foram alcançados nessa área como, por exemplo, a desinfecção de água de consumo e utilizada no ambiente da indústria, o que permite o controle de várias doenças. Entretanto, outras fontes de contaminação representam riscos à saúde pública (TAUXE, 1997).

1.2.10 O grupo coliformes

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* que inclui 44 gêneros e 176 espécies. No grupo dos coliformes totais estão apenas as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em um período de 24 horas a 48 horas a 35 °C. Quatro gêneros da família *Enterobacteriaceae* representam este grupo: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (JAY, 2005). Mais de 20 espécies se enquadram nessa definição, dentre as quais se encontrando tanto bactérias originárias do trato gastrintestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também bactérias não entéricas (BRENNER e FARMER III, 2005).

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamado de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose

em 24 horas a 44,5 °C a 45,5 °C, com produção de gás. Essa definição teve como objetivo, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal, como *E. coli*, porém, atualmente sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal.

1.2.11 *Escherichia coli*

E. coli está incluída no grupo dos coliformes totais e no grupo dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais.

A espécie *E. coli* pertence ao gênero *Escherichia*, classificado dentro da família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta também a lactose, com produção de ácido e gás (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Estirpes de *E. coli* são anaeróbias facultativas e colonizam o epitélio intestinal via pili P e fimbrias tipo I. Possuem motilidade por meio de flagelos ou são imóveis. A temperatura ótima de crescimento está na faixa dos 36 °C +/- 1,0 °C. São oxidases negativas, podendo usar o acetato como única fonte de carbono, o mesmo não acontecendo com o citrato, o qual não é utilizado pela bactéria. A glicose e outros carboidratos são fermentados com produção de piruvato, que são então convertidas a ácido láctico, acético e fórmico. Muitas estirpes, especialmente aquelas isoladas dos tecidos extra-intestinais, possuem cápsulas ou microcápsulas polissacarídicas (BRENNER & FARMER III, 2005).

E. coli foi inicialmente introduzida como indicador em 1892 na Austrália e em 1895 nos Estados Unidos. Foi usada para indicar a contaminação da água por material fecal e, conseqüentemente, alertar para a presença potencial de patógenos entéricos. Da água foram estendidos aos alimentos, sem uma avaliação muito criteriosa da validade dessa aplicação em diferentes produtos. Atualmente, a premissa de que altos números de *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias em alimentos estão correlacionados com contaminação fecal já não é válida, por uma séria de razões: 1) Esses organismos não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, e podem ser encontrados em reservatórios ambientais; 2) São comuns nos ambientes de manufatura de alimentos, e podem tornar-se parte da microbiota residente, principalmente se as condições

de limpeza são inadequadas; 3) Várias estirpes de *E. coli*, coliformes ou enterobactérias podem crescer em alimentos refrigerados (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

As principais aplicações desses microrganismos como indicadores, na verdade são: 1) indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha; 2) indicadores de falha do controle de contaminação pós processo em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico e 3) *E. coli* pode ser usada como indicador fecal em alimentos “in natura” (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

1.2.12 *Escherichia coli* O157:H7

1.2.12.1 Caracterização

As estirpes do sorotipo O157:H7 apresentam a maioria das características típicas da espécie *E. coli*, que são: teste de indol positivo (98 % das estirpes), teste de VM positivo (99 % das estirpes), teste de VP negativo (100 % das estirpes), teste de citrato negativo (99 % das estirpes), teste de H₂S negativo (99 % das estirpes) e teste de urease negativo (99 % das estirpes) (BRENNER et al, 2005).

As estirpes desse sorotipo fazem parte da classe das *E. coli* Shiga Toxigênicas (STEC), também chamadas de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC) ou *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC). Este grupo compreende as estirpes produtoras de verotoxinas, incluindo a *E. coli* O157:H7. A síndrome é decorrente da adesão da bactéria às células do epitélio intestinal e à ação de citotoxinas produzidas no intestino do indivíduo infectado. No momento são conhecidas pelo menos duas citotoxinas diferentes, chamadas de verotoxinas (VT I e II) em função do seu efeito citopático irreversível sobre células Vero (EDUARDO et al, 2002). Também são chamadas de toxinas shiga ou “shiga-like” toxinas (SLT I e II), em função da semelhança com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I (Weagant et al, 1995). Os genes responsáveis pela codificação das toxinas shiga, chamados *stx1* e *stx2*, são usados como marcadores em métodos moleculares de detecção ou confirmação das estirpes STEC.

A principal característica bioquímica de *Escherichia coli* O157:H7 inclui a incapacidade de fermentar o sorbitol em 24 horas e a inabilidade de produzir β -glicuronidase, uma enzima que quebra o 4-metilumbiferil- β -D-glicuronídeo (MUG) fornecendo um produto fluorescente, detectável sob luz UV (MENG e DOYLE, 1998). Além disso, difere da maioria das outras linhagens de *E. coli* já que cresce pouco ou não cresce a 44 °C (FORSYTHE, 2002). Esses fenótipos, especialmente a inabilidade para fermentar sorbitol, são usados extensivamente para isolar *E. coli* O157:H7 de alimentos (MENG et al, 2001).

1.2.12.2 Sorotipagem

A sorotipagem de *E. coli* é baseada nas diferenças antigênicas encontrada no envelope celular ou cápsula (antígenos K), na parede celular (antígenos O) e nos flagelos (antígenos H). Cada sorotipo é designado por uma fórmula contendo os antígenos somáticos, antígenos capsulares e os antígenos flagelares. *E. coli* O157:H7 significa antígeno somático O157, antígeno capsular ausente e antígeno flagelar H7 (SILVA et al, 2007).

Os antígenos somáticos “O” têm sua base química na diversidade de polissacarídeos da parede celular das bactérias Gram negativas. A parede celular é composta de uma camada interna de peptidoglicano, seguida de uma dupla camada lipídica externa, composta de lipoproteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são a parte mais externa da parede celular e têm a função de proteger as células dos fatores ambientais. São divididos em três porções, o lipídio A, interno, o core, intermediário e uma cadeia polissacarídica externa, que constitui a parte imunologicamente dominante da molécula (região antigênica “O”). Os fatores antigênicos são designados por números que vão de 1 a 173 (SILVA et al, 2007).

Os antígenos “H” são antígenos flagelares e são inativados pelo aquecimento a 100 °C. Esses antígenos compreendem a proteína flagelina, que são parte da estrutura flagelar da parede celular de *E. coli*, sendo designados por números que vão de 1 a 56. No isolamento primário muitas *E. coli* são pouco móveis ou não-móveis. Entretanto, muitas estirpes ao passarem através de um agar semi-sólido alcançam a motilidade. Somente essas

estirpes são apropriadas para determinação do antígeno H. As estirpes que não desenvolvem motilidade são designadas não-móveis (NM) ou H- (FORYSTHE, 2002).

Os princípios da sorotipagem são fundamentados no fato de que quando um certo carboidrato específico ou a molécula de proteína são injetados dentro do animal, este produzirá anticorpos, os quais irão se ligar especificamente às substâncias injetadas, as quais são conhecidas como antígenos. A sorotipagem é baseada em interações específicas de antígenos de carboidratos ou de proteínas com seus respectivos anticorpos (SILVA et al, 2007).

1.2.12.3 Patogenia

Apesar de ter sido primeiramente reconhecido como um patógeno em 1982 pode ter surgido entre 10 e 20 anos antes. Os acontecimentos atuais sugerem que, ao longo do tempo, *E. coli* foi infectada por um vírus que inseriu seu DNA no cromossomo da bactéria e um de seus genes passou a conter a informação para a produção de toxina Shiga (LANSBURY e LUDLAM, 1997). Esta linhagem é caracterizada por uma velocidade de mutação excepcionalmente alta com uma frequência de mutação 1000 vezes mais rápida do que nas linhagens mais comuns (LECLERC et al, 1996).

Atualmente há seis grupos de *E. coli* enteropatogênicas reconhecidos: 1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), 2) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), 3) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), 4) *E. coli* enteroagregativa (EAEC ou EAaggEC), 5) *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e 6) *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) (BRENNER et al, 2005).

Na classe STEC, da qual fazem parte as cepas de *E. coli* O157:H7, há cerca de 200 sorotipos de *E. coli* produtoras de verotoxinas (WHO, 1998), responsáveis por um amplo espectro de doenças, que vão de diarreias brandas à colite hemorrágica e doenças mais graves como a síndrome hemolítico urêmica (HUS) e a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (EDUARDO et al, 2002).

A colite hemorrágica é caracterizada por dores abdominais severas e diarreia, inicialmente aquosa e posteriormente sanguinolenta. Ocasionalmente ocorre vômito ou febre baixa. A doença é em geral auto-limitada, e tem duração de cerca de oito dias. A população alvo pode ser de qualquer faixa etária, sendo maiores os riscos para idosos,

crianças menores de cinco anos, indivíduos imunodeprimidos ou com problemas renais (WEAGANT et al, 1995).

De acordo com a literatura, cerca de 10 % dos casos de colite hemorrágica podem agravar-se, provocando um quadro conhecido como síndrome hemolítico urêmica (HUS), geralmente diagnosticado de 2 dias a 14 dias após o início da diarreia. É caracterizada pelo desenvolvimento de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, insuficiência renal aguda e distúrbios do sistema nervoso central como letargia, dor de cabeça severa, convulsões e encefalopatia (EDUARDO et al, 2002).

A HUS pode ocorrer em pacientes de qualquer faixa etária, mas crianças e idosos parecem ser mais suscetíveis. No Brasil a incidência não é conhecida, mas, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, há vários anos tem sido a causa mais comum de insuficiência renal em crianças na Argentina, onde cerca de 250 novos casos são relatados anualmente (WHO, 1997). A taxa de mortalidade encontra-se na faixa de 2 % a 7 %, mas em alguns surtos, especialmente entre os idosos, chega a 50 % (WHO, 1997). Outra conseqüência grave desta doença é o número significativo de sobreviventes que apresentam seqüelas permanentes, como insuficiência renal crônica, hipertensão e problemas neurológicos (Paton e Paton, 1998). Como não há uma terapia específica para a HUS, a maioria dos pacientes requer tratamento prolongado, envolvendo diálise, transfusão de sangue ou transplante de rins (USDA, 1994; WEAGANT et al, 1995).

A púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) é outra complicação extra intestinal que pode ocorrer nas infecções causadas pelas cepas EHEC. É uma doença mais rara, caracterizada por cinco sinais e sintomas: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, distúrbios neurológicos, confusão, afasia e alterações da consciência (ROCHA, 2003).

E. coli O157:H7 tem três fatores de virulência distintos os quais parecem ter um papel crucial na sua patogênese. O primeiro, e mais importante clinicamente, desses fatores de virulência é a produção de toxinas Shiga (SLT I e II) citotóxicas. Como previamente mencionado, *E. coli* O157:H7 provavelmente ganhou a habilidade para produzir a SLT I e II como um resultado de infecção com um bacteriófago carreando os genes *stx 1* e *stx 2*. Por meio de análise molecular, SLT I foi determinada ser homóloga a toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo I. SLT II compartilha 56 % de homologia da seqüência de nucleotídeos

com SLT I. EHEC O157:H7 produz uma ou ambas toxinas Shiga. A produção de SLT II parece ser significativo no desenvolvimento da HUS (GRIFFIN, 1995; ARMSTRONG et al, 1996; LANSBURY e LUDLAM, 1997; TAKEDA, 1997).

A toxina codificada por um fago é uma proteína de 70.000 daltons composta de uma subunidade A (32 KDal) e cinco subunidades B (7,7 KDal). A subunidade B provê uma especificidade do tecido pela ligação ao receptor globotriosilceramida na superfície de células eucarióticas. A subunidade A tem uma N-glicosidase que inativa o ribossomo 28S, conseqüentemente bloqueando a síntese protéica (BUCHANAN e DOYLE, 1997).

As toxinas Shiga de *E. coli* O157:H7 são citotóxicas para o cólon humano e células do íleo. Em modelos animais têm sido mostrados que a toxina causa acúmulo de fluido localizado e lesões colônicas.

O papel da produção da toxina Shiga na progressão da doença não está claro, embora haja a hipótese de que a toxina possa ter um papel no desenvolvimento da HUS por causar prejuízo vascular, provendo acesso para a toxina, LPS, hemolisina e outros mediadores pró-inflamatórios para a circulação geral (GRIFFIN, 1995).

E. coli O157:H7 também produz uma hemolisina o qual é relatada a hemolisina alfa de outras linhagens de *E. coli*. Ela é codificada pelo gene *hlyA*, o qual está localizado em um grande plasmídeo virulento. O antígeno hemolisina tem sido detectado no soro de 95 % dos pacientes com HUS (SCHMIDT et al, 1995). O papel da hemolisina na patogênese da infecção não está claro, embora tenha sido mostrado um aumento na secreção de 1-beta-interleucina. O 1-beta-IL aumenta a toxicidade da toxina Shiga acerca de células epiteliais vasculares humanas através de uma regulação dos receptores da superfície da célula para a toxina (GRIFFIN, 1995; SCHMIDT et al, 1995). A incidência de hemolisina nas linhagens que produzem toxina Shiga é alta, sugerindo uma possível ligação entre essas proteínas e a patogênese em doenças humanas (SCHMIDT et al, 1995).

O fator de virulência final é a habilidade de *E. coli* O157:H7 aderir-se e colonizar-se na superfície intestinal. A adesão à superfície da mucosa impede danos na bactéria via peristalse e promove a transferência da toxina para a superfície da célula de uma maneira concentrada (KUNTZ e KUNTZ, 1999). Paton et al (1997) demonstraram que linhagens deste organismo são três vezes mais aderentes a células intestinais humanas que linhagens de *E. coli* não-patogênicas.

O gene *eae* de *E. coli* O157:H7 codifica uma proteína chamada intimina. Esta proteína é responsável pelas alterações do citoesqueleto das células epiteliais da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local da adesão. Verifica-se ação nos vasos sanguíneos das microvilosidades, com eliminação de sangue nas fezes. A presença do gene *eae* foi fortemente associada com linhagens de EHEC de doenças humanas; esse gene foi encontrado em 90 % das linhagens de pacientes com HUS e 70 % das linhagens de pacientes com diarreia (GRIFFIN, 1995; PATON et al, 1997).

Pacientes com infecção por *E. coli* O157:H7 apresentam pouca ou nenhuma febre, o que sugere que o microrganismo não é invasivo e não penetra no sistema circulatório. Há uma colonização do trato intestinal, onde são elaboradas toxinas, as quais são subsequentemente ativadas no cólon (PADHYE e DOYLE, 1992).

1.2.12.4 Reservatório Animal

E. coli O157:H7 tem sido isolada de ovelhas (KUDVA et al, 1998), suínos (CHAPMAN et al, 1997), cervos (FISCHER et al, 2001) e cabras (PRITCHARD et al, 2000), mas o gado bovino é o reservatório primário deste patógeno com uma prevalência acima de 36,8 % (CHAPMAN et al, 1997). A presença de *E. coli* O157:H7 em gado bovino ilustra a complexa natureza do ambiente, práticas de criação do gado, segurança alimentar e ecologia microbiana (ISLAM et al, 2005). Uma vez ingerida, *E. coli* O157:H7 persiste no rúmen e cólon do animal, contaminando as fezes, e subsequentemente age como um veículo de transmissão horizontal para animais não-infectados (FAITH et al, 1996). Em um estudo realizado por Chapman et al (1997), amostras de fezes do reto foram coletadas imediatamente após o abate em reses, mensalmente, durante um período de um ano. *E. coli* O157 foi isolada em 15,7 % das amostras, sendo que 13,4 % provinham de animais de corte e 16,1 % de gado de leite. A prevalência mensal de *E. coli* O157 foi entre 4,8 % a 36,8 % e foi mais alta na primavera e verão.

A prevalência estimada de investigações realizadas em fazendas de gado varia de acordo com o objetivo do estudo, tipo e idade do gado amostrado, métodos microbiológicos e estação do ano. Em grandes estudos conduzidos nos EUA (HANCOCK et al, 1997a,b) foi constatado que a prevalência de rebanhos infectados pode ser alta, sugerindo que *E. coli*

O157 possa estar, no mínimo, presente intermitentemente em muitas fazendas de gado (HANCOCK et al, 1998). Em um desses estudos (HANCOCK et al, 1997a), a prevalência dentro do rebanho foi em geral menor, mas sujeita a flutuações pronunciadas, algumas vezes alcançando 10 % a 20 % ou mais, geralmente por períodos curtos e particularmente em meses de verão. Os bezerros desmamados e novilhas têm tido prevalência mais alta do que os animais adultos (GARBER et al, 1995; HANCOCK et al, 1997c). A persistência e a amplitude de *E. coli* O157 nas fazendas podem ser influenciadas pela prevalência na criação, magnitude e duração do desprendimento por animais individuais, sobrevivência e crescimento no ambiente da fazenda (CONEDERA et al, 2001).

A associação de *E. coli* O157:H7 à carne moída e ao leite cru levou a investigações sobre o papel do gado como reservatório do patógeno. Muitas pesquisas acerca do desprendimento fecal de *E. coli* O157:H7 produziram as seguintes observações:

- ✓ Animais jovens tendem a carrear *E. coli* O157:H7 mais freqüentemente do que animais adultos (ZHAO et al, 1995).
- ✓ A prevalência de excreções fecais varia substancialmente entre rebanhos positivos (HANCOCK et al, 1994; ZHAO et al, 1995).
- ✓ A incidência relatada entre animais varia amplamente, em parte devido às diferenças na sensibilidade dos procedimentos usados para detecção de *E. coli* O157:H7 (BUCHANAN e DOYLE, 1997).
- ✓ Numeros de *E. coli* O157:H7 em fezes de bezerros alcançam de $< 10^2$ UFC.g⁻¹ a 10^5 UFC.g⁻¹ (ZHAO et al, 1995).
- ✓ O desprendimento fecal de *E. coli* O157:H7 freqüentemente é intermitente e de curta duração, como por exemplo, de algumas semanas a meses (CRAY e MOON, 1995; BROWN et al, 1997).
- ✓ Mais de uma linhagem de *E. coli* O157:H7 podem ser isoladas de fezes do mesmo animal ou diferentes animais dentro de um mesmo rebanho (MENG et al, 1995; FAITH et al, 1996).

Bezerros têm sido experimentalmente infectados com *E. coli* O157:H7 (CRAY e MOON, 1995; BROWN et al, 1997) e os resultados revelaram que :

- ✓ *E. coli* O157:H7 não é patogênica para bezerros; a inoculação com 10^{10} UFC.g⁻¹ não induziu a doenças clínicas significantes.
- ✓ Os números de *E. coli* O157:H7 desprendidos em fezes diminuíram dramaticamente durante os primeiros 14 dias pós-inoculação, por exemplo, de 10^4 UFC.g⁻¹ a 10^6 UFC.g⁻¹ após 48 horas, para 5 UFC.g⁻¹ a 10^2 UFC.g⁻¹ em 14 dias.
- ✓ *E. coli* O157:H7 não coloniza a superfície da mucosa.

1.2.12.5 Transmissão de Infecção

As análises de surtos causados por *E. coli* O157:H7 estabeleceram as três principais rotas de transmissão: 1) alimentos contaminados, e água para beber ou água recreacional contaminadas, 2) transmissão pessoa-a-pessoa e 3) contato com animais.

1) Infecções transmitidas por alimentos

A contaminação da carne com EHEC de fezes bovinas ocorre durante o abate ou no processamento da carne e é a principal rota pela qual esses patógenos entram na cadeia alimentar (ARMSTRONG et al, 1996). Material fecal é também uma fonte de EHEC em produtos lácteos (ANONYMOUS, 1996). Portanto, o consumo de alimentos crus ou mal cozidos de origem bovina, particularmente hambúrguer e leite não-pasteurizado é a causa mais comum de transmissão de *E. coli* O157:H7 (KARCH et al, 1999).

A lista de veículos relatados de infecção por *E. coli* O157:H7 inclui rosbife (Rodrigue et al, 1995), salame (TILDEN et al, 1996), salsichas, iogurte (KUNTZ e KUNTZ, 1999), maionese (KUNTZ e KUNTZ, 1999) e leite cru (ANONYMOUS, 1996). Pode ser notado, entretanto, que carne devidamente tratada (AHMED e DONAGHY, 1998), produtos lácteos como leite pasteurizado (UPTON e COIA, 1994) e iogurte (MORGAN et al, 1993) serviram como veículos de *E. coli* O157:H7 em muitos surtos, possivelmente devido a contaminação cruzada. Produtos animais de outra origem que não seja bovina, por exemplo, leite de cabra cru (BIELASZEWSKA et al, 1998) e carne de cervo (KEENE et al, 1997a) foram também identificados como veículos de infecção por O157.

Recentemente, vegetais e frutas, provavelmente contaminados com esterco de gado durante a colheita ou no processamento foram implicados na transmissão de *E. coli* O157:H7, como por exemplo, alface (ACKERS et al, 1998), batatas (MORGAN et al, 1988), brotos de rabanete (WATANABE e OZASA, 1997) brotos de alfafa (CDC, 1997), mamão (FENG, 1995) e cidra ou suco de maçã não-pasteurizado (BESSER et al, 1993; CDC, 1996a). *E.coli* O157:H7 pode sobreviver por muitas semanas em fezes bovinas e esterco (Wang et al, 1996). Um alto grau de tolerância à acidez e secagem (GLASS et al, 1992; BENJAMIM e DATTA, 1995; LIN et al, 1996; TILDEN et al, 1996) garante a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em alimentos previamente considerados seguros (FENG, 1995; PATON et al, 1996). Uma vez em alimentos ou em seus ingredientes, *E. coli* O157:H7 exibe uma notável habilidade em sobreviver sob condições ambientais severas (ISLAM et al, 2005). Uma preocupação particular é a respeito de sua habilidade em sobreviver sob condições de refrigeração (NACMCF, 1999) e sua alta tolerância atípica a ácido. Por exemplo, a investigação de um surto de infecção por *E. coli* O157:H7 associado com cidra de maçã no sudeste de Massachusetts revelou que o patógeno, presumivelmente do esterco usado como fertilizante no pomar, sobreviveu no suco de maçã por 20 dias em pH abaixo de 4, condição previamente considerada suficiente para inibir o crescimento e sobrevivência de patógenos bacterianos e linhagens não-toxigênicas de *E.coli* (BESSER et al, 1993).

Samadpour et al (1994) detectaram a presença de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em porcos (18 %), ovelhas (48 %), frangos (12 %), perus (7 %), peixes (10 %) e moluscos (5 %), a maioria destes não têm sido identificados como veículos de infecções humanas. Isto sugere que as condições sob as quais STEC são transmitidas não são bem conhecidas e que veículos alternativos de transmissão para humanos devem ser considerados (KARCH et al, 1999).

2) Infecções transmitidas por água

Surtos de infecções por *E. coli* O157:H7 têm sido associados ao consumo de água contaminada (SWERDLOW et al, 1992; JONES e ROWORTH, 1996;) ou por natação em lagos (BREWSTER et al, 1994; KEENE et al, 1994; CDC, 1996b; HILDEBRAND et al, 1996;). *E. coli* O157:H7 é capaz de sobreviver em ambos, água para beber e recreacional por muitas semanas, especialmente em temperaturas frias (WANG e DOYLE, 1998). Estudos recentes sugerem que *E. coli* O157:H7 pode entrar em uma forma viável, mas não-cultivável, manifestada depois de persistir na água por 12 semanas (WANG e DOYLE, 1998). Pode ocorrer transmissão por meio da água, associada à natação, quando os nadadores ingerem pequenas quantidades de água contaminada (KEENE et al, 1994), e estas estão em concordância com a baixa dose infecciosa notada para *E. coli* O157:H7.

3) Transmissão pessoa-a-pessoa

Em função da baixa dose infecciosa de *E. coli* O157:H7, a transmissão oral-fecal pessoa-a-pessoa pode ocorrer facilmente em grupos de higiene pobre e contatos íntimos (KARCH et al, 1999).

Dessa maneira, a transmissão pessoa-a-pessoa tem emergido como uma rota predominante de infecção em surtos de *E. coli* O157:H7 em creches (BELONGIA et al, 1993; REIDA et al, 1994) e em instituições para pessoas com problemas mentais (PAVIA et al, 1990). Pessoas em idades extremas, por exemplo, muito jovens ou muito velhas, têm um maior risco de infecção por *E. coli* O157:H7. A fatalidade alcança de 3 % a 36 % (SU e BRANDT, 1995).

Em alguns surtos de toxinfecção alimentar, casos secundários atribuídos à transmissão pessoa-a-pessoa foram descritos (GRIFFIN e TAUXE, 1991). Este modo de transmissão é também considerado responsável pela disseminação de infecção por STEC dentro de famílias (LUDWIG et al, 1997) e em hospitais (KARMALI et al, 1988).

4) Contato com animais

A transmissão por meio do contato direto com o animal é documentada em surtos e infecções esporádicas por *E. coli* O157:H7 ligada a visitas na fazenda (RENEWICK et al, 1993; SHUKLA et al, 1995). O contato com animais parece ser em especial relevante no Reino Unido onde visitas educacionais a fazendas, com mais de 100.000 visitantes anualmente são populares, particularmente em escolas para crianças (SMITH et al, 1998).

Surtos associados ao contato com animais representam uma rota para transmissão de *E. coli* O157 reconhecida nos EUA. O pêlo do gado pode tornar-se contaminado com material fecal. Pessoas em contato com o gado ou superfícies no ambiente do gado podem contaminar suas mãos com *E. coli* O157. Se as mãos não são lavadas cuidadosamente após o contato com o gado ou com seu ambiente, a bactéria pode infectar essas pessoas por meio da rota mão-boca. Estratégias recentes publicadas para ajudar na redução da transmissão de patógenos entéricos de animais na fazenda para crianças incluem a informação ao público sobre os riscos para transmissão de patógenos entéricos de animais para humanos, separação de áreas para alimentação das áreas de contato com o animal e prover adequados locais para lavagem das mãos (CDC, 2001).

Dados do Centro para Controle e Prevenção da Doença (CDC) demonstraram maiores incidências de infecções por *E. coli* O157:H7 em áreas rurais dos EUA do que em áreas urbanas. Na Escócia, populações rurais correm maior risco de exposição a *E. coli* O157:H7 em função do maior contato com animais ou seus excrementos (LOCKING et al, 2001; O'BRIEN et al, 2001). Visitantes a fazendas leiteiras foram implicados como uma fonte para infecção na Finlândia (LAHTI et al, 2002) e nos EUA (CRUMP et al, 2002). O contato com animais é um fator de risco para o desenvolvimento da HUS na Suíça (KERNLAND et al, 1997).

1.2.12.6 Fatores que afetam a sobrevivência e o crescimento

Como toda bactéria, a sobrevivência e o crescimento de *E. coli* O157:H7 em alimentos dependem de interações de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, como temperatura, pH e atividade de água.

1) Temperatura

As linhagens de EHEC respondem à temperatura da mesma maneira que as linhagens não-EHEC, com exceção dos isolados do sorotipo O157:H7. *E. coli* são diferenciadas de outras *Enterobacteriaceae* com base na sua habilidade de crescer e produzir gás em caldo EC (*E. coli*) a 44,5 °C. Muitas linhagens de *E. coli* O157:H7, entretanto, não crescem bem a 44 °C (DOYLE e SCHOENI, 1984). Estudos com relação à temperatura de crescimento indicaram que esse microrganismo cresce rapidamente entre 30 °C a 42 °C, com tempos de geração variando de 0,49 h a 37 °C até 0,64 h a 42 °C (DOYLE e PADHYE, 1989). Palumbo et al (1995) encontraram que a temperatura mais alta para crescimento de *E. coli* O157:H7 dependia do meio de cultura; todas as linhagens cresceram em caldo Infusão cérebro coração (BHI) a 45 °C, mas 6 das 16 linhagens não cresceram em caldo EC.

A temperatura mínima para crescimento de *E. coli* O157:H7 sob condições ótimas é aproximadamente 8 °C a 10 °C (BUCHAMAN e BAGI, 1994; RAJKOWSKI e MARMER, 1995). Segundo Lansbury e Ludlam (1997), este organismo é extremamente tolerante ao frio, e sobrevive em temperaturas abaixo de 5 °C. O microrganismo pode sobreviver bem em carne moída congelada durante estocagem a -20 °C. Não há grandes alterações na população de *E. coli* O157:H7 em carne moída congelada a -80 °C e mantida a -20 °C por mais de 9 meses (PADHYE e DOYLE, 1992).

O efeito da temperatura sob a velocidade de crescimento de ambos, *E. coli* biótipo 1 e EHEC, foi determinado e modelos matemáticos foram desenvolvidos para descrever como a temperatura interage com o pH, atividade de água e nitrito de sódio para afetar a cinética de crescimento (BUCHAMAN e BAGI, 1994; SUTHERLAND et al, 1995).

Estudos sobre a inativação térmica de *E. coli* O157:H7 em carne moída revelaram que o microrganismo não apresenta intensa resistência ao calor (Tabela 6) sendo mais sensível ao calor que isolados típicos de *Salmonella* (DOYLE e SCHOENI, 1984; PADHYE e DOYLE, 1992). Além disso, no caso de leite o processo de pasteurização é capaz de inativar *Escherichia coli* O157:H7.

Tabela 6: Valores D para inativação de *Escherichia coli* O157:H7

TEMPERATURA (°C)	TEMPO (segundos)
57,2	270
60,0	45
62,8	24
64,3	9,6

Fonte: DOYLE e SCHOENI, 1984.

2) pH

As velocidades de crescimento são similares em valores de pH entre 5,5 e 7,5, mas declinam rapidamente em valores de pH mais baixos (BUCHAMAN e KLAWITTER, 1992). O pH mínimo para o crescimento de *E. coli* está entre 4,0 e 4,5 (BUCHAMAN e BAGI, 1994), e pode variar em função da interação do pH com outras características de crescimento, por exemplo, um estresse adicional aumenta o pH para crescimento e o tipo de ácido (ex., orgânico ou inorgânico) e sua concentração no meio (ABDUL-RAOUF et al, 1993).

Quando o pH é reduzido para valores abaixo do mínimo para crescimento, a população de *E. coli* O157:H7 declina ao longo do tempo. A sobrevivência do patógeno em alimentos ácidos é particularmente importante, considerando que muitos surtos são associados com a capacidade de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 nestes alimentos. Constatou-se experimentalmente que o patógeno sobrevive de muitas semanas a meses em uma variedade de alimentos ácidos, incluindo maionese (ZHAO e DOYLE, 1994), salsichas (CLAVERO e BEUCHAT, 1996), cidra de maçã (ZHAO et al, 1993) e queijo “Cheddar” (REITSMA e HENNING, 1996). A sobrevivência nestes alimentos aumenta consideravelmente quando armazenados sob refrigeração. Por exemplo, o patógeno sobreviveu em cidra de maçã por somente 2 dias a 3 dias a 25 °C, comparado com 10 dias a 31 dias a 8 °C (ZHAO et al, 1993).

Estirpes de EHEC podem ter um alto grau de tolerância a ácido, e sobrevivem durante 2 horas a 7 horas de exposição em pH 2,5 a 37 °C (BUCHANAN e EDELSON, 1996). Entretanto, estirpes de EHEC sensíveis a ácido também foram identificadas.

A tolerância do microrganismo ao ácido foi previamente documentada. Em experimento realizado por Arocha (1992), foi demonstrado que *Escherichia coli* O157:H7 pode sobreviver na presença de baixo pH e alta acidez produzida por bactérias lácticas durante a fabricação de queijo "cottage". Pode sobreviver à fermentação, desidratação, e estocagem de embutidos fermentados em pH 4,8 por mais de dois meses (ZHAO e DOYLE, 1994). Estudos determinaram que nem ácido acético, cítrico ou láctico em concentrações até 1,5 % e aplicados em carnes a 20 °C ou 55 °C reduziram apreciavelmente a contagem de *Escherichia coli* O157:H7 (ZHAO e DOYLE, 1994). Não foi observada nenhuma alteração na população de *Escherichia coli* O157:H7 em saladas de carne (pH 5,40 a 6,07) com até 40 % de maionese, mantidas a 5 °C, por até 72 horas (ABDOUL-RAOUF et al, 1993; ZHAO e DOYLE, 1994).

A tolerância a ácido em *E. coli* é um fenômeno complexo que depende da fase de crescimento. Células de *E. coli* na fase estacionária de crescimento são mais tolerantes a ácido do que as células na fase exponencial. Esta tolerância aumentada está associada com a expressão de genes regulados pelo operon fator sigma *rpoS* (CHEVILLE et al, 1996).

A indução da tolerância a ácido em *E. coli* pode aumentar sua sobrevivência em alimentos ácidos (CHEVILLE et al, 1996). Um estado de tolerância a ácido pode persistir por períodos extensos (≥ 28 dias) se as células forem armazenadas sob temperatura de refrigeração. A indução da tolerância a ácido também pode aumentar a habilidade do organismo em sobreviver a outros estresses. Resultados de estudos recentes indicam que a indução da tolerância a ácido também aumenta a resistência do microrganismo ao aquecimento, radiação e antimicrobianos (ROWBURY, 1995). *E. coli* também possui uma resposta de tolerância a álcalis (ROWBURY et al, 1996).

3) Atividade de água

Estudos sob o efeito da atividade de água sob a sobrevivência e crescimento de *E. coli* O157:H7 focaram primariamente sob o efeito do cloreto de sódio, embora, presumivelmente *E. coli* O157:H7 comporte-se similarmente a outras *E. coli*. Buchanan e Bagi (1994), desenvolveram um modelo matemático para efeitos e interações da concentração de NaCl (0,5 % a 5,0 %) com a temperatura, pH e NaNO₂ sob a cinética de

crescimento de *E. coli* O157:H7. Eles compararam o efeito do manitol, sorbitol e sacarose como umectante e concluíram que enquanto diferenças de umectantes ocorrem em valores de Aa limitantes, diferenças entre umectantes foram mínimas em Aa de 0,98. O crescimento de *E. coli* em concentrações altas de NaCl induziu a expressão do *rpoS* com um aumento associado na termotolerância e resistência a H₂O₂ (HENGGE-ArONIS et al, 1993). *E. coli* O157:H7 pode sobreviver por muitas semanas quando dessecado, principalmente sob temperatura de refrigeração.

4) Antimicrobianos

E. coli O157:H7 parece não ter nenhuma resistência aumentada em aditivos alimentares antimicrobianos (BUCHANAN e DOYLE, 1997).

1.2.12.7 Surtos Causados por *E. coli* O157

Uma estimativa de 73.480 enfermidades, em função de infecção por *E. coli* O157, ocorre a cada ano nos EUA, conduzindo uma estimativa de 2.168 hospitalizações e 610 mortes anualmente (MEAD et al, 1999).

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), o sorotipo O157:H7 é o mais freqüentemente associado a surtos relatados e documentados de colite hemorrágica e HUS. Há, entretanto, indicações claras de que o envolvimento de estirpes de outros sorotipos tem aumentado.

Nos EUA existe uma firma de advocacia que representa vítimas de intoxicação alimentar causada por *E. coli* O157:H7 e outros microrganismos. Desde 1993, esta firma tem representado milhares de clientes em ações litigiosas contra restaurantes e indústrias de alimentos, no qual esses alimentos foram implicados como fonte de doenças. Esta firma disponibilizou na rede uma relação atualizada com todos os surtos causados por *E. coli* O157:H7 nos EUA no período de 1988 a 2006 (MARLER CLARK, 2008).

De 1982 a 2002, um total de 350 surtos foram relatados em 49 estados nos EUA (Figura 3), estimando 8.598 casos de infecção por *E. coli* O157. Houve 1.493 (17,4 %) hospitalizações, 354 (4,1 %) casos de HUS e 40 (0,5 %) mortes. Entre esses surtos, as rotas

de transmissão de 183 (52 %) foram de origem alimentar, 74 (21 %) desconhecido, 50 (14 %) pessoa-a-pessoa, 21(6 %) água recreacional, 11 (3 %) contato com animais, 10 (3 %) água de beber e 1 (0,3 %) transmitido em laboratório (RANGEL et al, 2005).

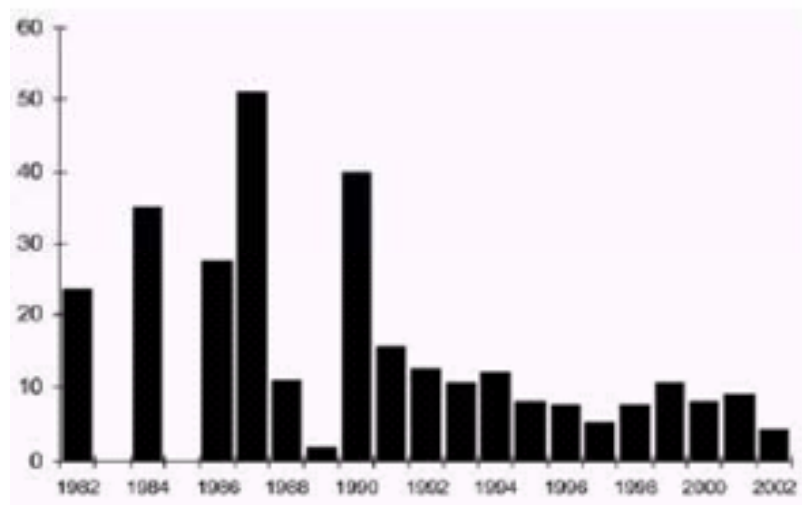


Figura 3: Número médio de surtos de *E. coli* O157 nos EUA no período de 1982 a 2002.

Fonte: RANGEL et al, 2005.

Dos 183 surtos de origem alimentar, 75 (41 %) foram causados por carne moída, 42 (23 %) foram de origem desconhecida, 38 (21 %) ocorreram associados a produtos, 11 (6 %) foram causados por carne bovina, 10 (5 %) foram originados de outros alimentos e 7 (4 %) de produtos lácteos (RANGEL et al, 2005).

Dos 7 surtos associados a produtos lácteos, 4 foram associados ao consumo de leite cru. Os outros foram associados ao coalho do queijo feito a partir do leite cru, de manteiga feita de leite cru e de sorvete comercial, possivelmente em função da contaminação cruzada (RANGEL et al, 2005).

O maior surto causado por *E. coli* O157:H7 ocorreu no Japão, em Sakai, Osaka, em 1996 (MICHINO et al, 1998). Este surto afetou mais de 8.000 pessoas, principalmente crianças em uma escola. Um total de 106 crianças desenvolveram HUS, onde 3 delas morreram (Tabela 8). Brotos de rabanete branco servidos como parte do almoço da escola foram identificados como o veículo mais provável da infecção.

Tabela 7: Surtos de infecções por *Escherichia coli* O157:H7 no mundo.

Local	Ano	Fonte	Nº de casos (mortes)	Referências
Canadá	1986	leite cru	46	Duncan et al, 1987
Inglaterra	1991	Iogurte	16	Ammon, 1997
EUA	1992 - 1993	hambúrguer	732 (4)	Bell et al, 1994
EUA	1992-1993	leite cru	14	Keene et al, 1997b
Inglaterra	1993	leite	7	Ammon, 1997
Escócia	1994	leite pasteurizado	100	Upton e Coia, 1994
Escócia	1994	queijo	22	Ammon, 1997
Canadá	1996	Suco de maçã	70 (1)	Cody et al, 1999
Escócia	1996	carne	501 (20)	Ahmed e Donaghy, 1998
Japão	1996	rabanete	8.000 (3)	Michino et al, 1998
EUA	2004 - 2005	animais	108	CDC, 2005b
EUA	2005	leite cru	18	CDC, 2005a
EUA	2006	espinafre	183 (1)	CDC, 2006

No Brasil, levantando-se apenas os casos de diarreia em humanos, a frequência de isolamento de cepas STEC é muito baixa (GUTH et al, 2002a; IRINO et al, 2002), porém comparável à observada em outras partes do mundo (PIÉRARD et al, 1997; BEUTIN et al, 1998). Desde 1989 o sorotipo O111:NM é o mais frequente em nosso ambiente (GUTH et al, 2002a), porém, dois casos de doenças associados com os sorotipos O157:H7 e O26:H11 já foram identificados (GUTH et al, 2002b).

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Coleta de dados e amostras

Inicialmente, foi aplicado um questionário para avaliação das condições de infraestrutura e higiênico-sanitárias das propriedades (Figura 4). As coletas foram realizadas em propriedades rurais de criação de gado situadas em Viçosa, Coimbra, São Miguel do Anta, Porto Firme e Paula Cândido (Figura 5), avaliando-se duas propriedades por município.

Em cada propriedade foram coletadas amostras de leite, ração, água, fezes, utensílios, equipamentos e ordenhador. As coletas foram realizadas no momento da ordenha e as amostras transportadas em caixas isotérmicas e levadas imediatamente ao laboratório para realização das análises microbiológicas. Cada propriedade foi amostrada por quatro vezes, durante um período de 1 ano, totalizando-se 488 amostras.

Figura 4: Questionário da avaliação das condições de infra-estrutura e higiênico-sanitárias de propriedades rurais de criação de gado leiteiro.

Nome da propriedade: _____

Data da coleta: _____

Localização da propriedade: _____

Grau de escolaridade: _____

1- Acesso e arredores

a) Qual é a distância entre a propriedade rural estudada e a cidade mais próxima?

1 - 5 Km (); 5 - 10 Km (); Mais de 10 Km ()

b) Quais as raças dos animais predominantes na propriedade rural?

c) Há outras espécies de animais criados na propriedade?

Suínos (); Aves (); Cães (); Gatos (); Outros () _____

d) Qual a forma predominante de criação dos animais?

Pasto (); Confinado (); Semi-confinado ()

e) Quantas pessoas trabalham na propriedade? _____

2- Características do estábulo

a) Qual é o aspecto externo ao estábulo?

Limpo (); Sujo (); Presença de mato ()

b) Qual é a estrutura do estábulo?

Idade 1 - 5 anos (); 5 - 10 (); 10 - 15 (); Mais de 15 anos ()

c) Qual é o estado de conservação dos cochos para alimentação?

Bom (); Regular (); Ruim ()

d) Qual é o estado de conservação dos bebedouros?

Bom (); Regular (); Ruim ()

e) Qual é o estado de conservação dos equipamentos para preparação da ração?

Bom (); Regular (); Ruim ()

3- Características da ordenha

a) Qual a produção diária da propriedade?

Menor que 50 L (); 50 - 100 L (); 100 - 300 L (); 300 - 500 L (); Acima de 500 L ()

b) Quantos animais têm a propriedade? _____

c) Qual o tipo de ordenha realizada na propriedade?

Manual (); Mecânica (balde ao pé) (); Mecânica (direta) ()

d) Como é a estrutura física para realização da ordenha?

Estábulo (); Sala de ordenha ()

e) Quantas ordenhas são realizadas por dia? _____

f) O leite após ordenhado é refrigerado?

Sim (); Não ()

g) Como é feita a refrigeração?

Expansão (); Imersão ()

4- Procedimento de limpeza do estábulo

- a) Como é feita a limpeza do estábulo?
Recolhimento do esterco (); Uso de água ()
- b) Qual a periodicidade de realização da limpeza?
Diariamente (); 1 vez por semana (); 2 vezes ao mês (); 1 vez ao mês ()
- c) Qual a origem da água utilizada na limpeza?
Mina (); Poço artesiano (); Semi-artesiano ()

5- Procedimento de limpeza na ordenha

- a) A pessoa responsável pela ordenha lava as mãos antes da realização da mesma?
Sim (); Não ()
- b) É feita a limpeza dos cochos e bebedouros?
Sim (); Não ()
- c) Qual a periodicidade de limpeza da sala de ordenha? _____
- d) Como é feita a limpeza dos equipamentos de ordenha?
Manual (); CIP ()
- e) Quais as soluções utilizadas na limpeza e desinfecção?

6- Procedimento de limpeza do animal

- a) Como é feita a preparação do animal antes da ordenha?
Não é feita (); Lava-se os tetos (); Lava-se todo o animal ()
- b) É utilizada solução desinfetante antes e após a ordenha?
Sim (); Não (); Somente após a ordenha ()
- c) O que é feito com os primeiros jatos de leite antes da ordenha?
Não são desprezados (); São desprezados (); Realizado teste da caneca e desprezado após ()
- d) Os animais são alimentados logo após a ordenha?
Sim (); Não ()

7- Práticas de alimentação e água de bebida

- a) Qual a origem da alimentação?
Pasto (); Silagem (); ração (); outros ()
- b) Qual a origem da água?
Mina (); Poço artesiano (); Semi-artesiano ()

8- Processamento do leite

- a) O leite é destinado à produção de queijo?
Sim (); Não ()
- b) Qual tipo?
Mussarela (); Minas frescal (); Requeijão ()
- c) Em que quantidade? _____
- d) É vendido leite fresco na porta? Quantos litros?
Sim (); Não ()
- e) Qual o local de comercialização?
Feira (); Comércio ()
- f) Como é o sistema de refrigeração? _____

9-Instalações de processamento

- a) O que é utilizado no processamento?
Vapor (); Gás ()
- b) O piso é azulejado?
Sim (); Não ()
- c) Existe tela nas janelas e portas?
Sim (); Não ()
- d) Há a presença de pedilúvio?
Sim (); Não ()
- e) São oferecidos cursos e treinamentos para as pessoas que trabalham no processamento?
Onde?
Sim (); Não ()
- f) Faz-se o uso de touca?
Sim (); Não ()
- g) Utiliza-se bota?
Sim (); Não ()
- h) E avental?
Sim (); Não ()

10- Controle de sanidade do rebanho

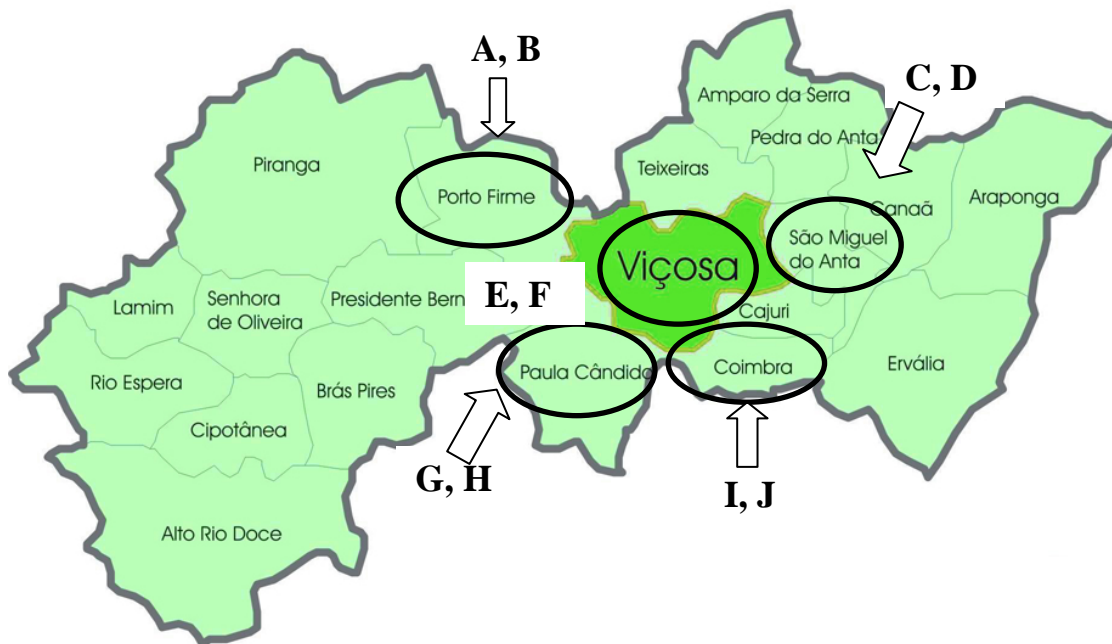
- a) Há uma ficha de registro para o controle de sanidade do rebanho?
Sim (); Não ()
- b) Quais as principais doenças que atingiram o rebanho nos últimos 2 anos?
Mastite (); Brucelose (); Tuberculose (); Outras ()
- c) Há veterinário na propriedade?
Sim (); Não ()
- d) Os animais são vacinados contra aftosa?
Sim (); Não ()

11- Controle de animais doentes

- a) Os animais doentes são separados dos animais sadios?
Sim (); Não ()
- b) O que é feito com o leite desses animais?
Desprezado (); Aproveitado ()

12- Controle de pragas e roedores

- a) Foi detectada a presença de roedores na propriedade?
Sim (); Não ()
- b) Como é feito o controle de roedores?
Isas (); Outros ()
- c) Utiliza-se inseticidas?
Sim (); Não ()



Fonte: Projeto GEOMINAS
Composição: IPLANUS

Figura 5: Mapa da microrregião de Viçosa.

1.3.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes

Em cada propriedade coletou-se, aproximadamente, 100 mL de leite em duas garrafas estéreis, retiradas diretamente do tanque de armazenamento ou do latão, logo após a ordenha. A partir destas, foram feitas diluições decimais apropriadas utilizando-se água peptonada 0,1 %.

A coleta da água também foi realizada em garrafas esterilizadas, retirando-se diretamente da caixa de abastecimento. Em cada propriedade coletou-se um volume de, aproximadamente, 100 mL.

A ração foi coletada em sacolas plásticas esterilizadas, sendo retirada uma porção de, aproximadamente, 200 g para cada tipo de ração que era usada na propriedade.

Os “swabs” também foram usados para a coleta de amostras a partir de utensílios e equipamentos, como baldes, latões, tanques e teteiras, e para as tetas dos animais e mãos

dos manipuladores. Para as paredes de baldes, latões e tanques foram utilizados “swabs” coletando-se amostras de 10 cm², sendo utilizado um “swab” para cada utensílio. Paralelamente, coletou-se amostras do fundo dos baldes e latões utilizando-se “swabs” individuais. Para todos os baldes e latões, as coletas foram realizadas antes do início da ordenha. Para as teteiras, as amostras foram coletadas utilizando-se um único “swab” que foi introduzido no conjunto. Para as tetas, a coleta da amostra foi realizada utilizando-se um “swab” para o conjunto de tetas da cada animal. Para as mãos dos manipuladores, a remoção ocorreu numa área correspondente às superfícies das palmas e bordas das mãos, partindo-se da região dos punhos. Os “swabs” foram passados com movimentos giratórios da parte inferior das palmas até a extremidade dos dedos e voltando ao punho, repetindo-se este procedimento por três vezes na direção de cada dedo. Posteriormente, passou-se entre os dedos, e no final, do outro lado da mão. Em cada propriedade foram escolhidos, ao acaso, 20 % do número total de animais para os “swabs” de tetas e fezes.

O NMP para coliformes termotolerantes foi determinado pela técnica de fermentação em tubos múltiplos, segundo Feng et al, (2002). O exame foi processado em duas etapas: prova presuntiva e prova confirmativa, sendo o método fundamentado em probabilidade, usado para obter-se uma estimativa do NMP.

Para o teste presuntivo alíquotas de 1 mL da amostra e suas diluições decimais foram inoculadas em tubos contendo 9 mL de Caldo Lauril Sulfato. Cada tubo possuía um tubo de Durham invertido. Adotou-se uma série de 3 tubos para cada diluição decimal. Os tubos foram incubados a 35 °C, por 24 horas a 48 horas. Após este período, os tubos que apresentaram reação positiva (meio turvo e produção de gás com formação de bolhas) foram submetidos aos demais testes.

A partir dos tubos que apresentaram resultados positivos no teste presuntivo foram retiradas alíquotas com auxílio da alça de repicagem que, subseqüentemente, foram inoculadas a novos tubos contendo caldo EC (Acumedia) com tubos de Durham invertidos, incubando-se a 45 °C, por até 48 horas em banho-maria. A prova foi considerada positiva nos tubos onde houve turvação do meio e produção de gás. O cálculo do NMP foi feito por meio da consulta à tabela do NMP (BLODGETT, 2006).

1.3.3 Isolamento de *E. coli* O157

Uma alíquota de 25 g ou 25 mL das amostras de leite, água e ração foram enriquecidas em 225 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) (Acumedia) suplementado com 20 mg.L⁻¹ de novobiocina, homogeneizado em “stomacher” por no mínimo 2 minutos com incubação por 18 h a 24 h, a 37 °C.

Os “swabs” foram transportados em tubos contendo 10 mL de água peptonada 0,1 %. De cada tubo retirou-se alíquotas de 1 mL que foram transferidas para tubos contendo 9 mL de caldo TSB suplementado com 20 mg.L⁻¹ de novobiocina (Oxoid), os quais foram incubados a 37 °C, por 18 h a 24 h.

As amostras enriquecidas foram plaqueadas em Ágar MacConkey Sorbitol (SMAC) (Acumedia) suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de cefixima e 2,5 mg.L⁻¹ de telurito de potássio (Himedia) e incubadas a 37 °C, por 18 h a 24 h. Após esse período, foram selecionadas cinco colônias típicas para a confirmação preliminar (FENG e WEAGANT, 2002). No Agar TC-SMAC as colônias de *E. coli* O157 são incolores ou acinzentadas, com centro esfumado e possuem diâmetro de 1 mm a 2 mm (Figura 6).

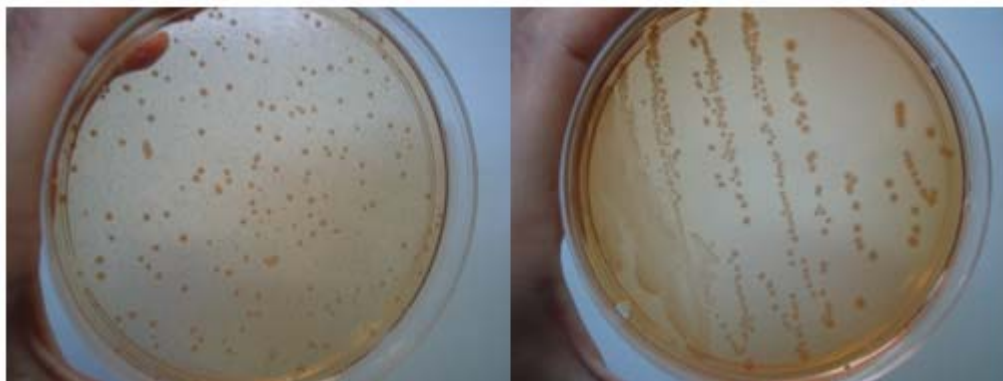


Figura 6: Colônias típicas de *E. coli* O157:H7 em meio SMAC

Todas as colônias identificadas bioquimicamente como não-fermentadoras de sorbitol no ágar TC-SMAC foram transferidas para placas contendo Ágar Tripticase de Soja (TSA) (Acumedia) suplementado com Extrato de Levedura (Biobrás) e incubadas a 36 °C, por 18 h a 24 h. Em seguida, foram selecionadas as colônias bem isoladas em TSA para a realização do teste do indol, utilizando-se reagente de Kovacs. As estirpes que apresentaram resultado positivo (coloração róseo) foram submetidas ao teste de aglutinação

com o *E. coli* O157 Latex Test Kit (Oxoid). De acordo com esses resultados, aglutinação e colônias indol-positivas foram reconhecidas como *E. coli* O157 (FENG e WEAGANT, 2002).

O experimento foi acompanhado de um controle positivo, que consistia em conduzir todos os testes com uma estirpe de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) fornecida pela FIOCRUZ.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Prevalência de coliformes termotolerantes em propriedades rurais de criação de gado leiteiro

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos para o Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes nas dez propriedades analisadas.

A contagem de coliformes termotolerantes para amostras de leite cru variou entre $< 0,3$ e 21 NMP.mL^{-1} , conforme a Tabela 9. O maior valor obtido (21 NMP.mL^{-1}) foi observado em amostras de leite coletados nas Propriedades A e C situadas, respectivamente, nos municípios de Porto Firme e São Miguel do Anta. Levando-se em conta que na Propriedade A a ordenha é realizada de forma manual e que as tetas são lavadas antes da ordenha, é provável que a contaminação por coliformes tenha sido introduzida no leite pelo contato com a água, que, pode ter contaminado as tetas e as mãos do manipulador. Nesta propriedade a ordenha é realizada no próprio estábulo e o leite não é refrigerado após a ordenha, havendo um intervalo de várias horas até a chegada do caminhão responsável pela coleta. Além disso, parte deste leite é vendido cru de porta em porta. Na Propriedade C foram observadas, além de uma alta contagem de coliformes termotolerantes no leite, uma maior contagem destes microrganismos nas tetas de uma das vacas ($> 110,0 \text{ NMP.teta}^{-1}$). Verificou-se contaminação na água, nas mãos do manipulador, utensílios e ração. Nesta Propriedade, a ordenha também é realizada de forma manual, no próprio estábulo e o estado de conservação dos cochos e bebedouros é precário, e a limpeza destes não é realizada. As tetas não são lavadas antes da ordenha e os primeiros jatos de

Tabela 8: Variação da contagem de coliformes termotolerantes em ambientes de produção de leite obtida pela técnica do NMP.

ANÁLISES		PROPRIEDADES									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Unidades		PORTO FIRME		SÃO MIGUEL DO ANTA		VIÇOSA		COIMBRA		PAULA CÂNDIDO	
Leite	UFC.mL ⁻¹	< 0,3 - 21	< 0,3 - 9,3	< 0,3 - 21	< 0,3 - 15	< 0,3 - 0,9	< 0,3 - 0,4	< 0,3 - 0,9	< 0,3 - 9,3	< 0,3 - 2,3	< 0,3
Tetas	UFC.teta ⁻¹	< 0,3 - 2,3	< 0,3 - 110,0	< 0,3 - > 110,0	< 0,3 - 7,5	< 0,3 - 24	< 0,3 - 24,0	< 0,3 - > 110,0	< 0,3 - 21	< 0,3 - > 110,0	< 0,3 - 110,0
Água	UFC.mL ⁻¹	< 0,03 - 0,93	< 0,03 - 0,75	< 0,03 - 0,93	< 0,03 - 0,04	0,03 - > 11,0	< 0,03 - 0,23	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03 - 0,04
Balde	UFC.cm ⁻²	< 0,3	-	< 0,3	-	< 0,3	< 0,3 - 2,3	-	-	-	-
F. do balde	UFC.balde ⁻¹	< 0,3	-	< 0,3	-	< 0,3	< 0,3 - 0,9	-	-	-	-
Latão	UFC.cm ⁻²	-	0,4 - 24	< 0,3 - 0,9	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-
F. do latão	UFC.latão ⁻¹	-	-	< 0,3 - 0,7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-
Teteira	UFC.teteira ⁻¹	-	< 0,3 - > 110,0	-	< 0,3	-	-	< 0,3	< 0,3	< 0,3 - 0,4	< 0,3
Mão	UFC.mão ⁻¹	< 0,3 - 2,1	< 0,3 - > 110,0	< 0,3 - 9,3	< 0,3 - 0,4	< 0,3 - 21,0	< 0,3 - 2,1	< 0,3 - 0,7	< 0,3 - > 110,0	< 0,3 - 0,4	< 0,3 - 2,8
Trigo/milho	UFC.g ⁻¹	-	< 0,3 - 46	-	-	-	-	-	-	-	-
Soja	UFC.g ⁻¹	-	< 0,3	< 0,3 - 110,0	-	-	-	-	-	-	-
Milho	UFC.g ⁻¹	-	-	< 0,3 - 110,0	-	< 0,3 - 23,0	-	-	-	-	-
Soja/milho	UFC.g ⁻¹	-	-	-	1,5	-	11 - > 1.100,0	-	-	-	-
Cana	UFC.g ⁻¹	-	-	-	> 110,0	-	-	-	-	-	-
Ração	UFC.g ⁻¹	-	-	-	-	-	-	< 3,0	< 0,3 - 21	< 3,0 - 4,0	< 3,0

- Não realizado

leite não são desprezados. O leite não é refrigerado após a ordenha, sendo todo o volume vendido de porta em porta.

Das amostras de leite cru analisadas, 29 (36,3 %) apresentaram uma contagem $\geq 0,3$ NMP.mL⁻¹. Este valor é muito superior ao valor constatado por Badini et al (1996) que observaram a ocorrência de 11 (18,35 %) amostras de leite cru contaminadas por bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes termotolerantes. Por outro lado, Queiroz (1995) observou a ocorrência de 39 (65 %) amostras de leite cru contaminadas pelos referidos microrganismos. Essas diferenças podem ser associadas às características peculiares do processo de obtenção do leite nos distintos municípios.

Os padrões microbiológicos para leite estabelecidos pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) encontram-se na Instrução Normativa nº 51 de 18/09/02 (BRASIL, 2002) e os da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, na Resolução RDC nº 12 de 02/01/01 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001). Porém, no que se referem aos coliformes termotolerantes, as legislações em vigor estabelecem apenas os padrões microbiológicos para o leite pasteurizado e não para o leite cru.

A qualidade microbiológica do leite obtido na maioria das propriedades visitadas neste estudo foi considerada boa, uma vez que mais da metade das amostras apresentou baixa contaminação, com uma contagem abaixo de 0,3 NMP.mL⁻¹ e, mesmo dentre aquelas amostras em que se detectou contaminação, os números não foram considerados altos, levando-se em conta que se trata de leite cru. Para efeito de comparação, os padrões estabelecidos para coliformes termotolerantes em leite pasteurizado pelo DIPOA (BRASIL, 2002) e ANVISA (BRASIL, 2001) são, respectivamente, de até 2 NMP.mL⁻¹ e 4 NMP.mL⁻¹.

Por outro lado, a contagem microbiana no leite cru antes de seu transporte à indústria depende da contaminação durante a ordenha, das condições de armazenamento, temperatura na qual o leite é armazenado e do tempo decorrido entre sua produção e coleta (BONFOH et al, 2003).

Na maioria das propriedades analisadas o leite não era refrigerado após a ordenha, ficava armazenado em latões por várias horas até a coleta, ou era vendido cru de porta em porta.

A saúde do rebanho, condições de ordenha e de pré-armazenamento são também determinantes básicos de qualidade do leite (AUMAITRE, 1999). As tetas freqüentemente tornam-se sujas com esterco, lama e materiais da cama, como palha, serragem, lascas de madeira ou areia. Se não for removida antes da ordenha, esta sujeira, junto com o grande número de microrganismos associados a ela, pode ser introduzida no leite (COUSIN, 1982). Além disso, uma ampla variedade de gêneros e espécies de microrganismos presentes no ambiente do rebanho pode estar presente na superfície das tetas e será transmitida ao leite e para os equipamentos de ordenha (CHAMBERS, 2002). No presente estudo, a contagem de coliformes termotolerantes nas tetas esteve entre $< 0,3$ a $> 110,0$ NMP.teta⁻¹ (Tabela 9), o que pode representar um perigo para a contaminação do leite, uma vez que, em muitas propriedades, a ordenha é realizada de forma manual e as tetas não são lavadas antes da ordenha. Isto foi observado na Propriedade C, em que foi constatada a relação entre a alta contagem de coliformes termotolerantes no leite e nas tetas. Para minimizar a contaminação bacteriana na superfície das tetas é essencial evitar o seu contato com sujidades entre as ordenhas, lavando-as com água contendo desinfetantes e secando-as cuidadosamente antes de acoplá-las aos equipamentos de ordenha. Além disso, a imersão das tetas em solução desinfetante após a ordenha pode auxiliar na cura de lesões da pele e reduzir patógenos causadores de mastite. Neste estudo, 30 % dos úberes não foram lavados antes da ordenha, nenhum dos produtores secava as tetas com papel absorvente e o uso de solução de iodo após a ordenha foi observado em 40 % das propriedades.

As mãos dos manipuladores e as teteiras também representam uma importante fonte de contaminação para o leite. Nos resultados da análise dos “swabs” constatou-se uma contagem de coliformes termotolerantes entre $< 0,3$ e $> 110,0$ NMP.mão⁻¹ e NMP.teteira⁻¹. O uso de equipamentos de ordenha e de transporte sujos, e a higiene pessoal do manipulador e sua prática de higiene no ato ordenha podem influenciar no número de microrganismos presentes no leite cru, o que contribui para a baixa qualidade higiênica do leite comercializado. Essas observações estão em concordância com as constatações de Kenya (GODEFAY e MOLLA, 2000) e de Bamako (BONFOH et al, 2003).

Foram realizados também coletas de amostras com “swabs” em utensílios, como baldes e latões, tanto para fundo quanto para paredes. Para as paredes, foram utilizados “swabs” coletando-se amostras de 10 cm². Para as propriedades nas quais a ordenha era

realizada de forma manual e com o uso de baldes, com exceção da Propriedade F, situada em Viçosa, que apresentou uma contagem de 2,3 NMP.cm⁻² para balde e 0,9 NMP.fundo do balde⁻¹, todas as outras apresentaram contaminação inferior a 0,3 NMP. No caso do latão, foi verificada uma contagem entre < 0,3 e 24,0 NMP.cm⁻² e < 0,3 e 2,3 NMP.fundo do latão⁻¹. Quando devidamente limpos, desinfetados e drenados os equipamentos de ordenha podem ser eliminados como fonte de contaminação do leite cru. Entretanto, limpeza e desinfecção inadequadas das superfícies de contato com o leite, incluindo latões e tanques, são consideradas as maiores fontes de bactérias depois de sua coleta do úbere. Para reduzir a contaminação do leite, utensílios e equipamentos usados na ordenha devem ser lavados e enxaguados com detergentes e desinfetantes imediatamente após o uso (FAO & WHO, 1997a,b). O uso de detergentes e água de boa qualidade para limpeza de equipamentos pode remover resíduos de leite, incluindo microrganismos, e, além disso, propiciar uma melhor qualidade microbiológica do leite (GRAN et al, 2002).

A água usada no processo de produção de leite deve ser de fonte segura, livre de patógenos e contaminação fecal. Porém, em muitos casos, a água da propriedade é oriunda de fontes não tratadas e pode estar contaminada com microrganismos de origem fecal. Uma contagem variando entre < 0,03 e > 11,0 NMP.mL⁻¹ de coliformes termotolerantes foi obtida nesse estudo. A maior contaminação foi observada na propriedade E, situada em Viçosa, onde a água é proveniente de nascente. Esse resultado indicou um grande potencial para introdução de patógenos no leite por meio da contaminação de tetas, utensílios e equipamentos. A qualidade microbiológica da água das fazendas poderia ser melhorada com a adição de cloro. A Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), estabelece, em relação ao padrão microbiológico de potabilidade da água para o consumo humano, a ausência de coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* em 100 mL, incluindo fontes individuais como poços, nascentes, dentre outras.

Foi observada também uma grande variação na contagem de coliformes termotolerantes na ração. A maior contaminação foi detectada na propriedade F, em Viçosa, com uma contagem superior a 1.100 NMP.g⁻¹ para a ração obtida no próprio local a partir de milho e soja. A qualidade microbiológica da ração e da água deve ser monitorada, pois, se contaminados, serão importantes veículos para a introdução de agentes patogênicos no rebanho.

1.4.2 Ocorrência de *Escherichia coli* O157 em propriedades rurais de criação de gado leiteiro

Das 488 amostras analisadas, foram isoladas apenas 15 estirpes de *Escherichia coli*, uma proveniente de leite (Propriedade B), uma de ração (Propriedade D), duas de tetas (Propriedades G e J), três de água (Propriedades A, B e F) e oito coletadas do ânus dos animais (Propriedades J). A incidência de coliformes e de *E. coli* no leite cru tem recebido considerável atenção. Isto se deve a sua associação à contaminação de origem fecal e o conseqüente risco de que outros patógenos de origem fecal estejam presentes e, parcialmente, em função da deterioração que pode ocorrer no leite mantido à temperatura ambiente (CHAMBERS, 2002).

As estirpes de *E. coli* não foram confirmadas como pertencentes ao sorogrupo O157, o que está em concordância com os achados de Ansay e Kaspar (1997) ao analisarem 1.104 amostras, incluindo leite cru e queijo. Estes autores encontraram *E. coli*, mas nenhuma *E. coli* O157:H7. Conedera et al (2004) também não encontraram *E. coli* O157 nos 1.814 produtos lácteos feitos com leite cru. Já Oksuz et al, (2004) analisaram 100 amostras de leite cru e 50 amostras de queijo feito com leite cru, e constataram apenas 1 (1 %) e 2 (4 %) estirpes de *E. coli* O157, respectivamente. Esses resultados sugerem que o risco de infecção é muito baixo, mas por outro lado, esta bactéria pode sobreviver por mais de 50 dias em reservatório municipal de água e em água de lago (WANG e DOYLE, 1998). Além disso, os rebanhos leiteiros são carreadores assintomáticos desta bactéria (ZHAO et al, 1995; WANG et al, 1997; HEUVELINK et al, 1998) o que aumenta o risco de transmissão gado-gado, leite para produtos lácteos e para outros alimentos. Por outro lado, Chye et al (2004) detectaram *E. coli* O157 em 312 (33,5 %) das 930 amostras de leite cru analisadas.

A não detecção de *E. coli* O157 nas amostras analisadas não indica necessariamente que esta não esteja presente. Jay (2005) sugeriu que a presença de altas concentrações de microrganismos em alimentos, típica de condições insatisfatórias de produção e beneficiamento, interfere diretamente na sobrevivência e multiplicação de patógenos, que necessitam de condições extremamente específicas para que o façam com sucesso. Assim, esses microrganismos podem estar presentes nos alimentos, porém em concentrações tão baixas o que reduz a chance de sua detecção, e confirma a baixa taxa de recuperação do

microrganismo no presente estudo e em diferentes trabalhos. Davis et al (2003) detectaram *E. coli* O157 em apenas 4 (0,8 %) das 475 amostras de fezes analisadas em uma propriedade rural de criação de gado leiteiro e nenhuma *E. coli* O157 foi isolada das 475 amostras de fezes de outra propriedade. Em um estudo realizado em São Paulo por Irino et al (2005), a taxa de isolamento de *E. coli* O157:H7 em fezes de gado leiteiro foi de 0,6 %, estando em concordância com dados de outros países (HANCOCK et al, 1994; RICHARDS et al, 1998). Porém, essa taxa de isolamento foi um pouco inferior à obtida no Rio de Janeiro por Cerqueira et al (1999) que isolaram 3 (1,5 %) de *E. coli* O157:H7 de fezes, sendo uma proveniente de gado de corte e duas de gado leiteiro.

Estudos com o emprego de procedimentos de enriquecimento e isolamento aperfeiçoados mostraram que a prevalência fecal de *E. coli* O157 pode ser maior do que a previamente reportada (HEUVELINK et al, 1998; JACKSON et al, 1998). Entretanto, nos países em desenvolvimento, em função do alto custo dos procedimentos de enriquecimento, como separação imunomagnética (TUTENEL et al, 2003), a detecção de estirpes O157 em amostras clínicas, gêneros alimentícios e em gados é feita principalmente pelo plaqueamento direto em SMAC. Esta limitação econômica pode levar a uma baixa proporção de isolamento de *E. coli* O157 e a falta de um meio diferencial para detecção de outros STEC não-O157 é uma desvantagem para identificação de STEC nesses países.

Alimentos também representam uma fonte potencialmente significativa desse patógeno para o rebanho leiteiro, principalmente em função da baixa dose infecciosa. Neste estudo não foi detectada a presença de *E. coli* O157 nas rações, resultado semelhante ao observado por Davis et al (2003) que encontraram apenas 5 amostras (0,2 %) positivas entre 2.591 amostras de ração e forragem. Algumas estratégias para a redução do grau de contaminação da alimentação animal incluem monitoramento microbiológico de ingredientes (DAVIES e WRAY, 1997), tratamento a quente (JONES et al, 1991), limpeza e desinfecção dos locais de armazenamento da ração (FEDORKA-CRAY et al, 1997) e proteção do alimento contra pássaros e roedores (DAVIES e WRAY, 1997).

1.5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos e as análises realizadas permitem concluir que:

- 1- Nas amostras de leite cru analisadas a contagem de coliformes termotolerantes variou de $< 0,3 \text{ NMP. mL}^{-1}$ a 21 NMP. mL^{-1} , onde 36,3 % das amostras indicaram uma contagem superior a $0,3 \text{ NMP. mL}^{-1}$;
- 2- Foi observada uma contagem de coliformes termotolerantes para tetas, mãos e teteiras entre $< 0,3 \text{ NMP}$ a $> 110,0 \text{ NMP}$;
- 3- A contagem de coliformes termotolerantes para utensílios esteve entre $< 0,3 \text{ NMP}$ a 24 NMP ;
- 4- Foi observada também uma contagem de coliformes termotolerantes para a água e para os diferentes tipos de ração entre $< 0,03 \text{ NMP. mL}^{-1}$ a $> 11,0 \text{ NMP. mL}^{-1}$ e $< 0,3 \text{ NMP.g}^{-1}$ a $> 1.100,0 \text{ NMP.g}^{-1}$, respectivamente;
- 5- Foram isoladas 15 estirpes de *Escherichia coli* sendo uma proveniente de leite, uma de ração, duas de tetas, três de água e oito de fezes;
- 6- As estirpes de *E. coli* não foram confirmadas como pertencente ao sorogrupo O157.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RAOULF, U.M.; BCUCHAT, L.R.; AMMAR, M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1999-2006, 1993.

ACKERS, M. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.177, p.1588-1593, 1998.

AGNESE, A.P. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no município de Soropédica-RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.91, p.58-61, 2002.

AHMED, S.; DONAGHY, M. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Central Scotland. In: KAPER, J.B; O'BRIEN, A.D. (Eds). **Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains**. Washington DC: ASM Press, 1998. p.59-65.

ALLERBERGER, F. et al. *Escherichia coli* O157:H7 infections and unpasteurised milk. **Eurosurveillance Monthly Archives**, Sweden, v.6, p.147-151, 2001.

AMMON, A. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. **Eurosurveillance**, Sweden, v.12, n.2, p.91-95, 1997.

ANDERSON, J.B. et al. A camera's view of consumer food-handling behaviors. **Journal of the American Dietetic Association**, Philadelphia, v.104, n.2, p.186-191, 2004.

ANONYMOUS. VTEC O157 infection in west York-shire associated with the consumption of raw milk. **Communicable Disease Report CDR Weekly**, Atlanta, v.16, p.181, 1996.

ANSAY, S.E; KASPAR, C.W. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.25, n.2, p.131, 1997.

ARMSTRONG G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS, J.G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, Oxford, v.18, p.29-51, 1996.

AROCHA, M.M. et al. Behavior of hemonhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, n.5, p.379-381, 1992.

AUMAITRE, A. Quality and safety of animal products. **Livestock Production Science**, v.59, p.113-124, 1999.

BADINI, K.B.; FILHO, A.N.; AMARAL, L.A. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.30, n.6, p. 549-552, 1996.

BARCELOS, A.L. et al. Síndrome hemolítico-urêmica: análise retrospectiva de 25 casos. Serviço de Nefrologia e Serviço de Pediatria. Hospital Universitário de Santa Maria/UFSM, 2000.

BARREIRA, V.B. et al. Pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de leite da cooperativa regional agropecuária de Macuco, município de Macuco, estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...**Passo Fundo: UFP, 2004.

BEAN, N.H. et al. Surveillance of foodborne disease outbreaks – United States, 1988-1992. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.45, p.1, 1996.

BELL, B.P.; GOLDOFT, M.; GRIFFIN, P.M. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.272, p.1349-1353, 1994.

BELMONTE, E.A.; LAGO, N.C.M.R. Pesquisa de microrganismos indicadores em leite pasteurizado integral comercializado nas cidades de Ribeirão Preto e Sertãozinho, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...**Passo Fundo: UFP, 2004.

BELONGIA, E.A. et al. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.269, p.883-888, 1993.

BELOTI, V. et al. Evaluation of Physicalchemical and microbiological characteristics of pasteurized milk types commercialized in Londrina city, Paraná, Brazil. **Epidemiologie et Sante Animale**, Alfort, n.311, p.4-50, 1997.

BELOTI, V. et al. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procopio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.20, n.1, p.12-15, 1999.

BELOTI, V. et al. Principais pontos de contaminação na produção leiteira e implementação de boas práticas. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa**, 2002.

BENJAMIN, M.M.; DATTA, A.R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1669-1672, 1995.

BESSER, R.E. et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.269, p.2217-2220, 1993.

BETTS, G.D. Controlling *E. coli* O157:H7. **Nutrition & Food Science**, Bingley, v.30, p.183-186, 2000.

BEUTIN, L.; ZIMMERMAN, S.; GEIER, K. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emerging and Infectious Diseases**, Atlanta, v.4, p.635-639, 1998.

BIELASZEWSKA, M.; JANDA, J.; BLAHOVA, K. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.119, p.299-305, 1998.

BLEEM, A. *E. coli* O157:H7 in raw milk – a review. In: COLLINS, C.O.F (Ed). **Animal health insight**. Colorado: USDA, APHIS, VS Center for Epidemiology and Animal Health, 1994. p.1-9.

BLODGETT, R. Appendix 2: Most probable number from serial dilutions. Feb. 2006. In: Food and Drug Administration – FDA/CFSAN. **Bacteriological Analytical Manual on line**. 2000. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>> Acesso em: 15 mar. 2007.

BOLTON, F.J.; CROZIER, L.; WILLAMSON, J.K. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from raw meat products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.23, p.317-321, 1996.

BONFOH, B. et al. Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). **Food Control**, Amsterdam, v.14, p.495-500, 2003.

BOOR, K.J. Pathogenic microorganisms of concern to the dairy industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v.17, n.11, p.714-717, 1997.

BRAMLEY, A.J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control – progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, p.51-481-512, 1984.

BRAMLEY, A.J.; MCKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. (Ed). V.1. **The Microbiology of Milk**. 2 ed. London: Elsevier, 1990. p.63-208.

BRASIL, Decreto-Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro, p.10785, jul. 1952.

BRASIL, Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 10 nov. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano... **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

BRASIL, Portaria nº 56, de 07 de dezembro de 1999. Submete a consulta pública os regulamentos técnicos de padrão de identidade e qualidade de leite... **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.34, 08 dez. 1999. Seção 2.

BRASIL, Portaria nº 166, de 05 de maio de 1998. Cria grupo de trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade... **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.42, 06 maio 1998. Seção 1.

BRASIL, Resolução nº 3.088, de 25 de junho de 2003. Dispõe sobre o programa de incentivo à mecanização, ao resfriamento e ao transporte granelizado... **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 jun. 2003.

BRENNER, D.J.; FARMER III, J.J. *Enterobacteriaceae*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. v.2. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005. p.587-607.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. v.2. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005.

BREWSTER, D.H. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.112, p.441-447, 1994.

BROWN, C.A. et al. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.27-32, 1997.

BRUM, J.V.F.; GONÇALVES, N.B.; MASSON, M.L. Pesquisa de microrganismos psicrotóxicos em leite cru produzido nos estados de Paraná e Santa Catarina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.33, p.182-185, 2004.

BUCHANAN, R.L.; BAGI, L.K. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p.317-322, 1994.

BUCHANAN, R.L.; DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. **Food Technology**, Chicago, v.51, p.69-76, 1997.

BUCHANAN, R.L.; EDELSON, S.G. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, Washington, v.62, p.4009-4013, 1996.

BUCHANAN, R.L.; KLAWITTER, L.A. The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, London, v.9, p.185-196, 1992.

BUENO, V.F.F. et al. Parameters of microbiological quality of raw milk and water in dairy farms in Goiás state - Brazil. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa**, 2002.

CARLOS, L.A. et al. Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo C comercializado no município de Campos de Goytacazes, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.123, p.57-61, 2004.

CARVALHO, M.G.X. et al. Análise microbiológica do leite in natura e pasteurizado tipo C proveniente de uma mini-usina da cidade de Patos, Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.123, p.62-66, 2004.

CDC – Center for Disease Control, USA. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfectionst.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2007.

CDC. *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking raw milk – Washington and Oregon, November – December, 2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.56, n.08, p.165-167, 2005a.

CDC. Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-Illinois, 1995. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.45, p.437-439, 1996b.

CDC. Ongoing Multistate Outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach - United States, September 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.26, p.1-2, 2006.

CDC. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with drinking unpasteurized commercial apple juice-British Columbia, California, Colorado and Washington, October, 1996. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.45, p.975, 1996a.

CDC. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with petting zoos – North Carolina, Florida and Arizona, 2004 and 2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.54, n.50, p.1277-1280, 2005b.

CDC. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.278, p.809-810, 1997.

CDC. Reducing the risk for transmission of enteric pathogens at petting zoos, open farms, animal exhibits, and other venues where the public has contact with farm animals. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.50, p.297, 2001.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.70, p.111-121, 1999.

CHAMBERS, J.V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. (Ed). **Dairy Microbiology Handbook**. 3 ed. New York: Wiley-Interscience, 2002. p.39-90.

CHAPMAN, P.A. et al. A 1-year of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.119, p.245-250, 1997.

CHEVILLE, A.M. et al. *rpoS* regulation of acid, heat and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1822-1824, 1996.

CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M.K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, London, v.21, p.535-541, 2004.

CLAVERO, M.R.S.; BEUCHAT, L.R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature and suitability of media for its recovery. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2735-2740, 1996.

CODY, S.H. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apples juice. **Annals of International Medicine**, Philadelphia, v.130, p.202-209, 1999.

COIA, J.E. et al. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cows' milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.66, p.63-69, 2001.

CONEDERA, G. et al. A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.66, p.85-93, 2001.

CONEDERA, G.; DALVIT, P.; MARTINI, M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 67-73, 2004.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.45, p.172-207, 1982.

CRAY, W.C.; MOON, H.W. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1586-1590, 1995.

CRUMP, J.A. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection among visitors to a dairy farm. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.347, p.555-560, 2002.

DAVIES, R.H.; WRAY, C. Distribution of *Salmonella* contamination in ten animal feedmills. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.51, p.159-169, 1997.

DAVIS, M.A.; HANCOCK, D.D.; RICE, D.H. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.95, p.199-210, 2003.

DESCHENES, G. et al. Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurized cheese. **Pediatric Nephrology**, Heidelberg, v.10, p.203-205, 1996.

DOYLE, M.P.; PADHYE, V.V. *Escherichia coli*. In: DOYLE, M.P. (Ed). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p236-282.

DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, p.855-856, 1984.

DUNCAN, L. et al. Poussée de maladie gastro-intestinale-Ontario. **Santé et bien-être social Canadá**, Ottawa, v.13, n.2, p.5-8, 1987.

EDUARDO, M.B.; MELLO, M.L.R.; KATSUYA, E.M. 2002. **Síndrome Hemolítico Urêmica-Normas e Instruções**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Agropecuária. Disponível em <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao>>. Acesso em: 11 dez. 2007.

ENTICOTT, G. Risking the rural: nature, morality and the consumption of unpasteurised milk. **Journal of Rural Studies**, Exeter, v.19, p.411-424, 2003.

FAITH, N.G. et al. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1519-1525, 1996.

FAO and WHO (1997a). The Codex Alimentarius Commission and the FAO/WHO Food Standards Programme. FAO, Rome.

FAO and WHO (1997b). General Requirements (Food Hygiene). Codex Alimentarius (Supplement to vol. 1B). FAO, Rome.

FARIAS, A.X. et al. Avaliação da qualidade do leite, quanto à presença de resíduos de antibióticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.33, p.428-430, 2004.

FEDORKA-CRAY, P.J.; HOGG, A.; GRAY, J.T. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. **Journal of Swine Health and Production**, Guelph, v.5, p.189-193, 1997.

FENG, P. *Escherichia coli* sorotipo O157:H7 novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerging and Infectious Diseases**, Atlanta, v.1, p.47-52, 1995.

FENG, P.; WEAGANT, S.D. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Sept. 2002. In: Food and drug administration – FDA/CFSAN. **Bacteriological Analytical Manual on line**. 1998. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>> Acesso em: 04 mar. 2007.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Sept. 2002. In: Food and drug administration – FDA/CFSAN. **Bacteriological Analytical Manual on line**. 1998. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>> Acesso em: 15 mar. 2007.

FISCHER, J.R. et al. Experimental and field studies of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.1218-1224, 2001.

FLOWERS, R.S.; ANDREWS, W.; DONNELLY, C.W. Pathogens in milk and milk products. In: MARSHALL, R.T. (Ed). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16 ed. Washington: APHA, 1992. p.103-212.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 176p.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B.D.G.M. et al. Foodborne diseases in Southern South América. In: MILIOTIS, M.; BIER, J. (Eds.) **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Marcel Dekker: New York, 2003, p.733-743.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FRANCO, R.M. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.68/69, p.70-77, 2000.

FRENZEN, P.D. Deaths due to unknown foodborne agents. **Emerging and Infectious Diseases**, Atlanta, v.10, n.9, p.1536-1543, 2004.

GARBER, L.P. et al. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.207, p.46-49, 1995.

GARCIA, C.A. et al. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite “in natura”. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.70, p.36-50, 2000.

GLASS, K.A. et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2513-2516, 1992.

GODEFAY, B; MOLLA, B. Bacteriological quality of raw cow's milk from four dairy farms and a milk collection centre in and around Addis Abada. **Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, Berlin, v.113, p.276-278, 2000.

GRAN, H.M.; MUTUKUMIRA, A.N.; WETLESEN, A. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: hygienic practices during milking and the microbiological quality of the milk at the farm and on delivery. **Food Control**, Amsterdam, v.13, p.41-47, 2002.

GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. In: BLASER M.J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.L.; GREENBERG, H.D.; GUERRANT, R.L. (Eds). **Infection of the Gastrointestinal Tract**. New York, NY: Raven Press, 1995. p.739-761.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, Oxford, v.13, p.60-98, 1991.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.102/103, p.25-34, 2002.

GUTH, B.E. et al. First shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. **Emerging and Infectious Diseases**, Atlanta, v.8, p.535-536, 2002b.

GUTH, B.E.; RAMOS, S.R.T.S; CERQUEIRA, A.M.F. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz On Line**, v.97, n.8, p.1085-1089, 2002a. Disponível em <<http://memorias.ioc.fiocruz.br/978/4607.html>> . Acesso em: 21 mar. 2006.

HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; RICE, D.H. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and impact of management practices. In: KAPER, J.B; O'BRIEN, A.D. (Eds). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains**. Washington DC: ASM Press, 1998. p.85-91.

HANCOCK, D.D. et al. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.113, p.199-207, 1994.

HANCOCK, D.D. et al. Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in cattle. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, p.363-366, 1997a.

HANCOCK, D.D. et al. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, p.462-465, 1997b.

HANCOCK, D.D. et al. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.118, p.193-195, 1997c.

HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and milk products. In: MARTH, E.H., STEELE, J.L. (Eds). **Applied Dairy Microbiology**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.59-76.

HENGGE-ARONIS, R. et al. Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, p.259-265, 1993.

HEUVELINK, A.E.; VAN DEN BIGGELARR, F.L.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farm. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p.3480-3487, 1998.

HILDEBRAND, J.M. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. **Communicable Disease Report CDR Review**, London, v.6, p.33-36, 1996.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 04 fev. 2005.

IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 (STEC isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.105, p.29-36, 2005.

IRINO, K. et al. O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.8, n.4, p.446-447, 2002.

ISLAM, M. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Food Microbiology**, London, v.22, p.63-70, 2005.

JACKSON, S.G.; GOODBRAND, R.B.; JOHNSON, R.P. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.120, p.17-20, 1998.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. ASPEN Publishers, Gaithersburg, MD. 2005, 854pp.

JOHNSON, E.A.; NELSON, J.H.; JOHNSON, M. Microbiology safety of cheese made from heat-treated milk, Part II. Microbiology. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, p.519-540, 1990.

JONES, F.T.; AXTELL, R.C.; RIVES, D.V. A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.54, p.502-507, 1991.

JONES, I.G.; ROWORTH, M. An outbreak of *Escherichia coli* O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. **Public Health**, London, v.110, p.277-282, 1996.

JONES, T.F.; GERBER, D.E. Perceived etiology of foodborne illness among public health personnel. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.7, n.5, p.904-905, 2001.

KARCH, H. et al. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, North Liberty, v.34, p.229-243, 1999.

KARMALI, M.A. et al. Hospital-acquired *Escherichia coli* O157:H7 associated hemolytic uremic syndrome in a nurse. **Lancet**, New York, v.1, p.526, 1988.

KEENE W.E. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.227, p.1229-1231, 1997a.

KEENE W.E. et al. A Prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.176, p.815-818, 1997b.

KEENE W.E. et al. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.331, p.579-584, 1994.

KERNLAND, K.H. et al. How is hemolytic-uremic syndrome in childhood acquired in Switzerland? **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, Zurich, v.127, p.1229-1233, 1997.

KOIDE, E.M.; GIROTO, J.M. Verificação da presença de resíduos antimicrobianos em leite *in natura* na região dos Campos Gerais - Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.33, p.436-438, 2004.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p.69-82.

KUDVA, I.T.; BLANCH, K.; HOVDE, C.J. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure slurry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.3166-3174, 1998.

KUNTZ, T.B.; KUNTZ, S.T. Enterohemorrhagic *E. coli* infection. **Fourth Prize Paper**, p.192-196, 1999.

LAHTI, E. et al. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Rotterdam, v.21, p.189-195, 2002.

LANSBURY, L.E.; LUDLAM, H. *Escherichia coli* O157:H7: lessons from past 15 years. **Journal of Infection**, Sheffield, v.34, p.189-193, 1997.

LECLERC, J.E. et al. T.A. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. **Science**, Cambridge, v.274, p.1208-1210, 1996.

LEIGH, J.A. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? **Veterinary Journal**, Amsterdam, v.157, p.225-238, 1999.

LEME, F.B.P. et al. Presença de resíduos de antimicrobianos de uso veterinário em amostras de diferentes tipos de leite comercializados na cidade de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...Passo Fundo: UFP**, 2004.

LIN, J. et al. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.3094-3100, 1996.

LOCKING, M.E. et al. Risk factors for sporadic cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection: the importance of contact with animal excreta. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.127, p.215-220, 2001.

LOURENÇO, L.F.H.; SILVA, M.S.S. Análises físico-química e microbiológica como indicadores da qualidade do leite cru comercializado no município de Castanhal/Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza. **Resumos...**Fortaleza: Centro de Convenções Edson Queiroz, v.1, 2000, p.3153.

LUDWIG, K. et al. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in a larger family. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Rotterdam, v.16, p.238-241, 1997.

MACEDO, R.E.F.; JÚNIOR, S.B.P. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado na região metropolitana de Curitiba, PR. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.128, p.103-108, 2005.

MACKENZIE, E. Thermotolerant and psychrotrophic organisms on poorly cleaned milking plants and farm bulk tanks. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.36, p.457, 1973.

MARLER CLARK. About *E. coli*. Disponível em: <<http://www.about-ecoli.com/page5.htm>>. Acesso em: 23 jan. 2008.

MCKINNON, C.H.; PETTIPHER, G.L. A survey of sources of heat-resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. **The Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.50, n.2, p.163-170, 1983.

MCLAUCHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.92, p.15-33, 2004.

MEAD, P.S.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 (Seminar). **Lancet**, New York, v.352, p.1207-1219, 1998.

MEAD, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.5, p.607-625, 1999.

MENG, J.; DOYLE, M.P. Microbiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. In: KAPER, J.B., O'BRIEN, A.D. (Eds). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains**. Washington DC: ASM Press, 1998. p.98.

MENG, J. et al. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from raw milk, ground beef and calf fezes using pulsed field electrophoresis and plasmid DNA analysis. **Journal of Medical Microbiology**, Spencers Wood, v.42. p.258-263, 1995.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p.331-341.

MICHINO, H.; ARAKI, H.; MINAMI, S. Recent outbreak of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: KAPER, J.B; O'BRIEN, A.D. (Eds). **Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains**. Washington DC: ASM Press, 1998. p.73-81.

MONTEIRO, A.A.; VACCARELLI, E.R.S.; BARROS, M.A.F. Aspectos higiênico-sanitários no fluxograma de uma usina de beneficiamento de leite: interferência sobre a qualidade do produto final. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...**Passo Fundo: UFP, 2004.

MORGAN D.; NEWMAN C.P.; HUTCHINSON, D.N. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.111, p.181-187, 1993.

MORGAN D.; NEWMAN C.P.; PALMER, S.R. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.101, p.83-91, 1988.

NACMCF (National Advisory Committee on Microbiological criteria for Foods). Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh products. **Food Control**, Amsterdam, v.10, p.117-143, 1999.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n.2, p.119-124, 2001.

NERO, L.A. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. 2005. 141f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

NERO, L.A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M.M.S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão - PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.1, p.21-26, 2003.

O'BRIEN, S.J.; ADAK, G.K.; GILHAM, C. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.7, p.1049-1051, 2001.

OKSUZ, O. et al. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. **Food Control**, Amsterdam, v.15, p.453-456, 2004.

PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, Pathogenesis, and Methods for Detection in Food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, n.7, p.555-565, 1992.

PALUMBO, S.A. et al. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, p.352-356, 1995.

PATON, A.W. et al. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.1622-1627, 1996.

PATON, A.W. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, p.3799-3805, 1997.

PATON J.C.; W PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.11, p.450-479, 1998.

PAVIA, A.T. et al. Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: Clinical and epidemiologic observations. **The Journal of Pediatrics**, New York, v.116, p.544-551, 1990.

PEREIRA, M.A.; RODRIGUES, KL.; MOREIRA C.N. *Escherichia coli* verotoxigênica em leite cru e beneficiado em Pelotas, RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Resumos...Foz do Iguaçu**, 2001. p.405.

PIÉRARD, D.; STEVENS, D.; MORIAU, L. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v.3, p.531-539, 1997.

PONSANO, E.H.G. et al. Adequação do leite produzido na região de Araçatuba aos padrões preconizados pela IN51 - MARA. Parte 2: leite individual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...Passo Fundo: UFP**, 2004.

PRITCHARD, G.C. et al. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal bacteriological study. **The Veterinary Record**, London, v.147, p.259-264, 2000.

QUEIROZ, J.C. Avaliação sanitária do leite cru distribuído nos Municípios de Juititaba e Itapeperica da Serra, São Paulo, 1990-1992. 1995. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.

RAJKOWSKI, K.T.; MARMER, B.S. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, p.1307-1313, 1995.

RANGEL, J.M. et al. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.11, p.603-609, 2005.

REIDA, P.; WOLFF, M.; POHLS, H.W. An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. **International Journal of Medical Microbiology**, Orlando, v.281, p.534-543, 1994.

REITSMA, C.J.; HENNING, D.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, p.460-464, 1996.

RENWICH, S.A.; WILSON, J.B.; CLARKE, R.C. Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and human. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.168, p.792-793, 1993.

RICHARDS, M.S.; CORKISH, J.D.; SAYERS, A.R. Studies of the presence of verocytotoxic *Escherichia coli* O157 in bovine faeces submitted for diagnostic purposes in England and Wales and on beef carcasses in abattoirs in the United Kingdom. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.120, p.187-192, 1998.

RICHTER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk product. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p.483-495.

ROCHA, H.H.A.G. Diagnóstico diferencial das principais causas de sangramento em uma unidade de emergência – visão clínica e laboratorial. **Laes & Haes**. Edição 142, 2003.

RODRIGUE, D.C.; MAST, E.E.; GREENE, K.D. A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and a unusually benign clinical course. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.172, p.1122-1125, 1995.

ROWBURY, R.J. An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. And other enterobacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.20, p.333-337, 1995.

ROWBURY, R.J.; LAZIM, Z.; GOODSON, M. Regulatory aspects of alkali tolerance induction in *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.22, p.429-432, 1996.

RYSER, E.T. Public health concern. In: MARTH, E.H., STEELE, J.L. (EDs). **Applied Dairy Microbiology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998. p.263-403.

SAMADPOUR, M. et al. Ocorrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1038-1040, 1994.

SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.78, p.3-17, 2002.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, v.63, p.1055-1061, 1995.

SHUKLA, R. et al. *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor centre. **Communicable Disease Report CDR**, Atlanta, v.5, p.R86-90, 1995.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O. Occurrence of *Listeria* spp. in critical points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.81, p.241-248, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3 ed. São Paulo: varela, 2007. 552p.

SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.A.; OKAZAKI, M.N. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **REV NET-DTA**, v.8, p.129-134, 2003. Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/revnet/revnet_n803.htm>. Acesso em: 20 mar. 2006.

SILVA, W.P. et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian Dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.2, p.103-106, 2000.

SMITH, H.R. et al. Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* in the United Kingdom. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. (Eds). **Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains**. Washington DC: ASM Press, 1998. p.49-58.

STEELE, M.L. et al. Survey of Ontario bulk tank raw milk from food-borne pathogens. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.11, p.1341-1346, 1997.

SU, C.; BRANDT, L.J. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. **Annals of International Medicine**, Philadelphia, v.123, p.698-714, 1995.

SUTHERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J.; BRAXTON, D.S. Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: The effects of temperature, pH and sodium nitrite. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.25, p.29-49, 1995.

SWERDLOW, D.L.; WOODRUFF, B.A.; BRADY, R.C. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annals of International Medicine**, Philadelphia, v.117, p.812-819, 1992.

TAKEDA, Y. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **World Health Statistic Quarterly**, v.50, p.74-80, 1997.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: an envolving public health challenge. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.3, n.4, p.425-434, 1997.

TKAEZ, M.; FEDALTO, L.M.; PEDRASSANI, D.; THIEM, E.M.B. Níveis microbiológicos e físico-químicos do leite *in natura* de produtores do estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...**Passo Fundo: UFP, 2004.

TILDEN, J. et al. A new route of transmission for *Escherichia coli*: Infection from dry fermented salami. **American Journal of Public Health**, Washington, v.86, p.1142-1145, 1996.

TODD, E. C. D.; HARWING, J. Microbial risk analysis of food in Canada. **Journal of Food Protection**, Des Moines, suppl., p.10-18, 1996.

TREVENA, W.B. et al. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*: Infection associated with farms. **Lancet**, New York, v.347, p.60-61, 1996.

TUTENEL, A.V.; PIERARD, D.; VANDEKERCHOVE, D. Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.94, p.341-346, 2003.

UPTON, P.; COIA, J.E. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurized milk supply. **Lancet**, New York, v.344, p.1015, 1994.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.82, p.2402-2411, 1999.

USDA (United States Department of Agriculture). ***Escherichia coli* O157:H7: issues and ramifications**. Colorado: Center for Epidemiology and Animal Health, 1994, 48p.

VAN WERVEN, T.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; DAEMEN, A.J.J.M. Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.80, p.67-74, 1997.

VERAS, J.F. et al. Monitoring of the raw milk quality and sanitation of teats and dairy equipment. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...**Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, 2002.

VIANA, L.R. et al. Qualidade do leite *in natura* recebido pela usina escola de laticínios da UFSC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...**Gramado: Hotel Casa da Montanha, 2002.

WANG, G.; DOYLE, M.P. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, p.662-667, 1998.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2567-2570, 1996.

WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, p.610-613, 1997.

WATANABE, Y.; OZASA, K. An epidemiological study on an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Rinsho Byori**, Osaka, v.45, p.869-874, 1997.

WEAGANT, S.D. BRYANT, J.L.; JINNEMN, K.G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n.01, p.7-12, 1995.

WELLS, J.G. et al. Isolation of *Escherichia coli* sorotipo O157:H7 and other shiga-like toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, p.985-988, 1991.

WHO. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. **WHO/FSF/FOS/97.6**, World Health Organization, 1997.

WHO. Zoonotic non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **WHO/CSR/APH/98.8**, Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Berlin, Germany, 23-26 June 1998. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/WHO_CSR_APH98.8.pdf> . Acesso em: 21 mar. 2006.

ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; FISHER, V.E.A. Mastite e qualidade microbiológica do leite em sistemas de produção da região sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...**Passo Fundo: UFP, 2004.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; BESSER, R.E. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider without preservatives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.2526-2530, 1993.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, p.780-783, 1994.

ZHAO, T. et al. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1290-1293, 1995.

CAPÍTULO 2

Adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em superfícies utilizadas no processamento de alimentos

2.1 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana em superfícies de contato é uma grande preocupação para a indústria de alimentos. Sob condições favoráveis, as células bacterianas podem aderir às superfícies e reproduzirem-se. Se não forem completamente removidas, essas células podem contribuir para a formação de uma complexa comunidade microbiana o que comprometerá a qualidade e segurança dos alimentos.

Em ambientes naturais, todo material exposto às condições mínimas requeridas para o desenvolvimento microbiano como a existência de água, moléculas orgânicas e sais minerais, são em geral contaminados por microrganismos. Se há disponibilidade destas substâncias e de condições ambientais favoráveis, a contaminação inicial pode evoluir para a formação de biofilmes.

O alimento pode ser contaminado por bactérias deterioradoras e patogênicas indesejáveis provenientes dos biofilmes. Portanto, a formação de biofilmes causada por problemas de higienização causa perdas econômicas associada à deterioração do alimento e persistência de patógenos, o que reduz o prazo de validade dos produtos desde o processamento até a comercialização.

Sistemas de ordenha automáticos usados com frequência na indústria de laticínios são construídos de borracha, aço inoxidável ou plástico. Como toda superfície inerte, estes materiais são pontos potenciais para formação dos biofilmes, até mesmo quando programas

de limpeza e sanitização são corretamente aplicados. Uma vez estabelecidos, os biofilmes podem agir como uma fonte potencial de contaminação do leite pela possibilidade de liberação de microrganismos da superfície para o fluido.

Várias superfícies podem estar envolvidas com a adesão bacteriana em diferentes tipos de equipamentos. Diversas superfícies empregadas nas indústrias de alimentos, como o aço inoxidável, vidro, borracha, fórmica, polipropileno, polietileno, policarbonato, teflon e ferro forjado suportam a formação de biofilmes, além de superfícies de alimentos, como frutas, vegetais, carcaças de animais e peixes.

Muitos microrganismos estão envolvidos na adesão e formação de biofilmes. Bactérias deterioradoras e patogênicas podem participar de processos de adesão e, eventualmente, originar problemas de saúde pública ou de ordem econômica. *E. coli* O157:H7 é conhecida por produzir exopolissacarídeos (EPS), que podem prover uma barreira física para proteger as células contra estresses ambientais.

O presente trabalho teve por objetivos: 1) avaliar a formação de biofilmes por *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 # 4 (AIN), PVC revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}) e PVC revestimento fino com tecido (PVF_{RF}) nos tempos de 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 10 horas de contato na temperatura de 37 °C, e 2) modelar e avaliar matematicamente a formação de biofilmes por *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) sob as mesmas superfícies nas temperaturas de 12 °C, 17 °C, 28 °C, 39 °C e 44 °C nos tempos de contato de 0 h, 7 h, 24 h, 41 h e 48 horas.

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 Adesão bacteriana

A adesão microbiana ocorre em função da deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; ZOTTOLA, 1997).

A adesão bacteriana a superfícies sólidas é um fenômeno geral, o qual é reconhecido como o primeiro passo no desenvolvimento de biofilmes (VALCARCE et al, 2002) e pode levar a uma variedade de problemas, como a corrosão de superfícies metálicas (BEECH e GAYLARDE, 1989) e a contaminação cruzada de alimentos processados (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000).

A sanitização de equipamentos processadores de alimentos é importante para o controle da contaminação cruzada durante a produção. Limpeza e desinfecção são procedimentos que devem ser realizados regularmente, considerando que eliminam grande parte dos microrganismos contaminantes do equipamento. Todas as superfícies de processamento de alimentos são lugares potenciais para a adesão bacteriana, que podem ocorrer até mesmo quando programas de limpeza e sanitização são corretamente aplicados. Deste modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

A eficiência dos processos de limpeza e sanitização de superfícies é reduzida pela presença de microrganismos aderidos. Isto constitui um problema com o aumento do uso de procedimentos automáticos de limpeza e equipamentos complexos, que podem apresentar

locais que facilitam o desenvolvimento de processos de adesão (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000).

Vários estudos mostram os fatores que influenciam a adesão bacteriana em superfícies envolvidas no processamento de alimentos. Dentre estes fatores incluem-se fase de crescimento da célula (STONE e ZOTTOLA, 1985), tipo e propriedades do material da superfície inerte (HAYES, 1993), presença de matéria orgânica (LEJEUNE, 2003), temperatura de incubação (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000) e pH do meio (HERALD e ZOTTOLA, 1988). Alguns autores citam outros fatores envolvidos com a adesão de bactérias como as características do microrganismo, espécie, carga, hidrofobicidade, concentração, presença de apêndices superficiais, como *pili*, fímbrias, flagelo, cápsula; a síntese de substâncias exopoliméricas; as características do material aderente, como carga e microtopografia; e as características do meio que envolve o microrganismo, tal como tempo de contato e turbulência (TROLLER, 1993; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BOWER et al, 1996).

Czechowski (1990) constatou que as bactérias aderem quase que imediatamente as superfícies com as quais elas entram em contato, até mesmo em baixas temperaturas, como 5 °C e 11 °C. Entretanto, a consolidação e o subsequente aumento da população na superfície do biofilme são dependentes do tempo e o crescimento da maioria dos microrganismos seria retardado a baixas temperaturas (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000).

A adesão bacteriana depende das propriedades físico-químicas do material do substrato e da superfície da célula. A possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e metais depende da composição química da superfície do metal e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE et al, 2002).

A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são forças físico-químicas envolvidas na aderência de microrganismos às superfícies sólidas. A hidrofobicidade está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa do microrganismo. Acredita-se que interações hidrofóbicas apresentem papel relevante na adesão de microrganismos em superfícies inertes para processamento de alimentos e em superfícies de alimentos, a exemplo da carne. As superfícies com alta carga

elétrica, como o vidro, suportam melhor o processo de adesão do que as superfícies com menor carga, como o poliestireno (DENYER et al, 1993).

Embora os mecanismos não sejam completamente entendidos, esses fatores físico-químicos têm um papel importante na aderência microbiana (HOOD e ZOTTOLA, 1995). Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, em função do modo de crescimento e das condições de cultivo (KUMAR e ANAND, 1998).

As células bacterianas e o substrato adquirem cargas superficiais geralmente negativas, como resultado da adsorção de íons ou de ionização de grupos de superfície. Essas cargas de superfície podem atrair íons com carga contrária, que estão na fase aquosa circundante. Assim, quando a bactéria está próxima da superfície do substrato, interações começam a se desenvolver, as quais são resultantes das cargas positivas e negativas que circundam as duas superfícies. A magnitude dessa força depende do potencial das duas superfícies, da força iônica e da constante dielétrica do meio circundante, além da distância entre a bactéria e o substrato (DENYER et al, 1993).

A temperatura e o pH também influenciam o mecanismo de adesão da bactéria. Stone e Zottola (1985) observaram que *Pseudomonas fragi* aderiu em superfície de aço inoxidável em escoamento contínuo de leite e produziu fimbria em 30 minutos a 25 °C e em duas horas, a 4 °C.

2.2.2 Biofilmes bacterianos

Na natureza e nos alimentos, os microrganismos aderem-se às superfícies e crescem como uma comunidade (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

O desenvolvimento de biofilmes microbianos ocorre frequentemente nas indústrias de alimentos, onde grande quantidade de nutrientes está disponível aos microrganismos, como por exemplo, quando válvulas, gaxetas de borracha e as partes internas de tubulações de aço inoxidável são colonizadas por microrganismos (BERESFORD et al, 2001; LEREBOUR et al, 2004). Nesses pontos, se não houver higienização completa, certamente haverá condições favoráveis ao crescimento de microrganismos (ALLISON et al, 2000).

Os biofilmes são constituídos por bactérias que se aderem a superfícies e que são envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, ou seja, depósitos onde os

microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, conhecidos por glicocálix ou exopolissacarídeos. Os biofilmes contêm, além de microrganismos, partículas de proteínas, lipídios, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, formando uma espécie de crosta, debaixo da qual os microrganismos continuam a crescer, caracterizando um cultivo “puro” ou uma associação com outros microrganismos (CRIADO et al, 1994).

Não há consenso a respeito do número de células que é necessário para formar os biofilmes. Ronner e Wong (1993) consideraram como biofilme um número de 10^3 células aderidas por centímetro quadrado, enquanto Wirtanen et al (1996) e Andrade et al (1998b) afirmaram ser necessária, além da produção de exopolissacarídeos, uma população de células de 10^5 e 10^7 células por centímetro quadrado, respectivamente, para que um biofilme possa ser considerado estável.

A formação de biofilmes, por outro lado, pode ser desejável para a indústria de alimentos e para outros fins. Em estações de tratamento de água ou de efluentes há remoção de organismos patogênicos e redução da quantidade de matéria orgânica na água ou efluentes através da interação com biofilmes (XAVIER et al, 2005). Para a indústria de alimentos, alguns exemplos podem ser citados, como a produção de vinagre (BOLETTI, 1921), ácido cítrico e vinho, no qual as bactérias produtoras de ácido acético crescem em biofilmes sobre camadas finas dos tonéis de madeira ou de concreto apresentando como função a conversão do substrato em produto final (SAKURAI et al, 1997).

A adesão e a formação de biofilmes microbianos podem ser indesejáveis, sob diversos aspectos na indústria de alimentos, uma vez que eles podem tornar menos eficiente o processo de cloração da água (BEER et al, 1994), reduzir a eficiência de transferência de calor em trocadores de calor (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994), reduzir o escoamento em tubulações (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994), desencadear processos corrosivos (BEECH, 2004) e, principalmente, tornarem-se fontes de contaminação microbiana (BEER et al, 1994). Sob o aspecto microbiológico, a adesão pode constituir-se de microrganismos alteradores e, ou, patogênicos, que resultam em graves problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica (CRIADO et al, 1994).

Muitas bactérias, em seus habitats naturais, podem existir em duas formas diferentes: no estado planctônico, em que se apresentam de forma livre, e no estado sésil,

em que estão aderidas a uma superfície (MARSHALL, 1992). O principal conceito do estudo de biofilmes é a diferença no estado fisiológico destas bactérias (LEJEUNE, 2003).

Estudos têm mostrado que a população no biofilme apresenta diferenças entre células planctônicas e células aderidas (LEJEUNE, 2003). Os biofilmes diferem em seu metabolismo, estrutura química, características de superfície da célula, resistência a agentes químicos e físicos comumente usados em procedimentos de higienização, entre outros (ALLISON et al, 2000). As células estão envolvidas em uma matriz polimérica e são diferentes fenotipicamente de quando crescem em suspensão. Uma das maiores diferenças é o aumento da resistência, na ordem de 10 vezes a 100 vezes, aos agentes antimicrobianos (DRUGGAN et al, 1993).

Os biofilmes são naturalmente heterogêneos e, por essa razão a quantificação da morfologia é o principal problema (MIDELET e CARPENTIER, 2004). Embora a função e a aparência de biofilmes em vários ambientes sejam diferentes, todos os biofilmes originam-se da mesma seqüência de eventos (BOS et al, 1999; FORSYTHE, 2002). Segundo estes autores, sua formação ocorre na seguinte seqüência de eventos (Figura 1):

i) Os nutrientes dos alimentos são adsorvidos na superfície formando um filme condicionante. Isso leva a uma alta concentração de nutrientes, comparada com a fase líquida, e favorece a formação de biofilmes. A camada de nutrientes afeta ainda as propriedades físico-químicas da superfície, como, por exemplo, a energia livre da superfície, as mudanças na hidrofobicidade e as cargas eletrostáticas, as quais influenciam e dão condições à colonização microbiana.

ii) Os microrganismos aderem à superfície condicionante. A adesão inicial das bactérias por forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interação hidrofóbicas é reversível. Mais tarde, a adesão é irreversível devido às ligações mais fortes como interações dipolo-dipolo, ligações covalentes e iônicas e interações hidrofóbicas. Os flagelos bacterianos, as fimbrias e os exopolissacarídeos estão envolvidos no contato com filmes condicionantes. O exopolissacarídeo é importante na adesão célula-célula e célula-superfície e também protege as células contra a desidratação.

iii) As bactérias irreversivelmente aderidas crescem e dividem-se, formando microcolônias, as quais aumentam e depois se unem para formar uma camada de células que cobre a

superfície. Durante essa fase, as células produzem polímeros adicionais que aumentam sua fixação e estabilizam a colônia contra flutuações do ambiente.

iv) A adesão contínua e o crescimento das células bacterianas, conjuntamente com a formação de exopolissacarídeos, levam a formação de biofilmes. A camada de biofilme pode ter vários milímetros de espessura em questão de dias.

v) Com o tempo, o biofilme começa a liberar partículas relativamente grandes de biomassa. As bactérias das partes liberadas podem contaminar o alimento, distribuindo-se de forma não homogênea no alimento ou iniciar a formação de um novo biofilme na linha de produção.

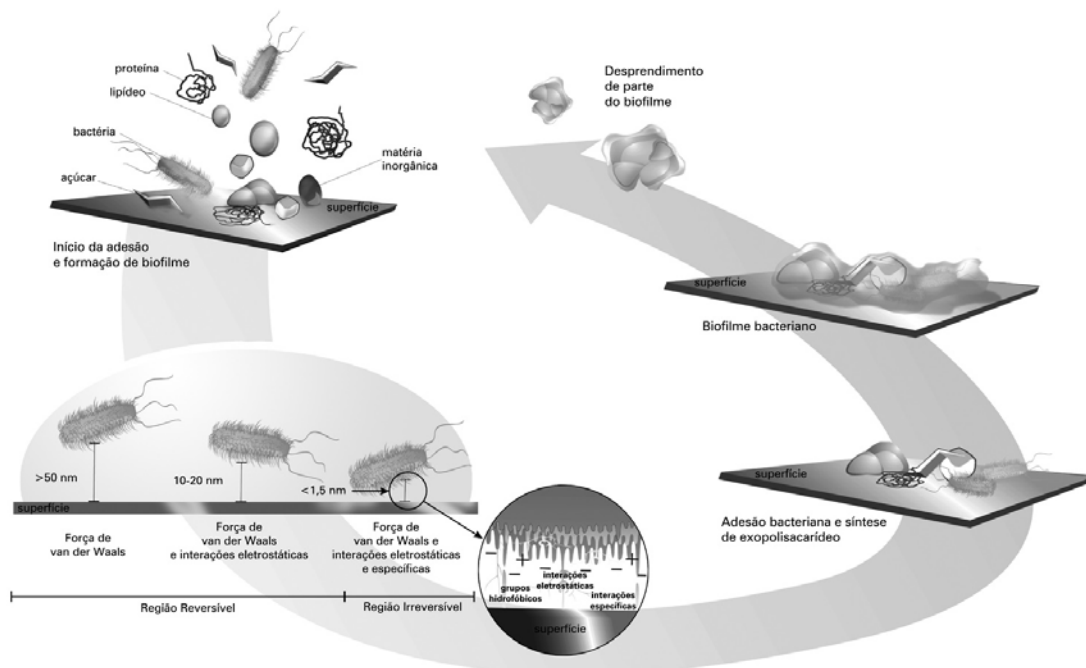


Figura 1: Mecanismo teórico da formação de biofilmes. Fonte: ANDRADE, 2008.

Após a fixação inicial de células bacterianas, o resultado das etapas seguintes define a estrutura e a atividade do biofilme. Estas etapas incluem todos os fatores físicos envolvidos no processamento de biofilmes e alguns fatores biológicos como crescimento, divisão celular e produção de exopolissacarídeos (XAVIER et al, 2005).

A forma de prevenção e controle de biofilmes é outro aspecto importante e objeto de pesquisas. Geralmente, uma limpeza e um programa de sanitização efetivos inibirão a formação de biofilmes.

No controle e na prevenção de biofilmes microbianos, a etapa de remoção de resíduos é fundamental. Um biofilme microbiano presente em uma superfície com resíduos oriundos do alimento impede uma efetiva penetração do sanitizante para inativar os microrganismos. O sanitizante reage, também, com resíduos de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais. Assim, a atividade antimicrobiana sanitizante será prejudicada. Sabe-se que quando o biofilme é tratado corretamente com detergentes, antes do uso de sanitizantes, a população de microrganismos será reduzida. No entanto, procedimentos de higienização incorretos não removem e nem inativam os microrganismos aderidos (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994). Tratamentos mecânicos e a quebra química da matriz de polissacarídeos são necessários para a remoção de biofilmes (FORSYTHE, 2002).

As bactérias aderidas são cobertas com material orgânico o qual pode inibir a penetração do sanitizante em função da perda de propriedades umectantes. Portanto, a atividade de detergência é necessária para remover essa camada externa, antes da utilização de um sanitizante. Os microrganismos mortos devem ser removidos, pois, do contrário, podem agir como um filme condicionante e como fonte de nutrientes para uma posterior formação de um novo biofilme. Novos agentes de limpeza e tratamentos enzimáticos são formulados para a remoção efetiva de biofilmes (FORSYTHE, 2002).

O desenho e o projeto dos equipamentos também são aspectos importantes para a prevenção e o controle de biofilmes. Um desenho adequado de equipamentos como tanques, dutos e juntas facilita a limpeza da linha de produção. A microtopografia da superfície pode complicar os procedimentos de limpeza quando fendas e outras imperfeições protegem as células aderidas. O aço inoxidável resiste aos danos de impacto, mas é vulnerável à corrosão, enquanto superfícies emborrachadas são propensas à deterioração e podem desenvolver rachaduras onde as bactérias podem se acumular (LE CLERCQ-PERLAT e LALANDE, 1994).

Muitos microrganismos estão envolvidos na adesão e formação de biofilmes, incluindo bactérias deterioradoras e patogênicas. Dentre as alteradoras encontram-se: *Pseudomonas aeruginosa* (HEYDOM et al, 2002), *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp.

(CRIADO et al, 1994), *Pseudomonas fluorescens* (ROSSONI e GAYLARDE, 2000; VALCARCE et al, 2002), *Enterococcus faecium* (ANDRADE et al, 1998a) e *Shewanella putrefaciens* (HJELM et al, 2002). Entre as bactérias patogênicas incluem-se *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium* (LEJEUNE, 2003), *Listeria monocytogenes* (LEJEUNE, 2003), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (POMPERMAYER e GAYLARD, 2000), *Vibrio parahaemolyticus* (WONG et al, 2002), *Klebsiella pneumoniae* (DI MARTINO et al, 2003) e *Escherichia coli* O157:H7 (DEWANTI e WONG, 1995).

Em um estudo realizado por Peters et al (1999), vários patógenos foram isolados de comunidades de biofilmes. Neste estudo, *Listeria* spp. foi encontrada em 35 % das superfícies de contato com alimentos e em 42 % de fontes ambientais, com *Staphylococcus aureus* presente em um total de 7 % e 8 %, respectivamente. Joseph et al (2001), relataram a presença de bactérias, como *Klebsiella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* enterohemorrágica em biofilmes.

Estudos realizados comprovaram que *E. coli* O157:H7 pode formar biofilme sob superfícies de aço inoxidável (DEWANTI e WONG, 1995; RYU et al, 2004a; RYU et al, 2004b) e o desprendimento de células pode resultar em uma contaminação cruzada dos alimentos durante o processamento (FRANK et al, 2003). Stopforth et al, (2003) mostraram que *E. coli* O157:H7 adaptada a ácido teve uma maior sobrevivência e prevalência em biofilmes sobre superfícies de aço inoxidável. A resistência das células bacterianas embebidas no biofilme a estresses ambientais, como sanitizantes rotineiramente usados nas indústrias de alimentos pode ser consideravelmente aumentada (FRANK et al, 2003).

E. coli O157:H7 é conhecida por produzir exopolissacarídeos (EPS) (MAO et al, 2001), os quais podem prover uma barreira física para proteger as células contra estresses ambientais. EPS estão também envolvidos na adesão das células e formação do biofilme (FRANK, 2000). Além disso, os EPS podem servir como um filme condicionante sob superfícies inertes, o que afeta a união da célula por funcionar como um aderente ou anti-aderente e influenciar a formação de um biofilme de estrutura tridimensional (DANESE et al, 2000).

Segundo estudo conduzido por HOLA et al, (2002) em uma indústria de alimentos, estirpes microbianas, por exemplo, *E. coli* e *L. monocytogenes*, foram encontradas nas superfícies de trabalho e produtos, e algumas dessas cepas foram

persistentes. As células estavam embebidas na matriz orgânica do biofilme, o qual mostra que a estrutura do biofilme formado afeta o modo pelo qual as superfícies devem ser limpas. OULAHAL-LAGSIR et al (2003) constataram que o tratamento com enzima glicolítica e proteolítica associado com ultra-som aumenta a remoção de biofilme formado por *E. coli* em superfícies de aço inoxidável suja com leite.

Além de células vegetativas, os esporos bacterianos também podem participar dos processos de adesão às superfícies. Estes são de grande interesse, uma vez que são muito resistentes aos tratamentos térmicos, irradiação, desidratação, vácuo, congelamento e diversos agentes químicos (TORTORA et al, 2000).

2.2.3 Superfícies utilizadas no processamento de alimentos

A Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997 do SVS/MS (BRASIL, 1997) aprova o “Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, definindo as condições técnicas para a utilização de materiais que compõem equipamentos e utensílios. De acordo com esta Portaria, todo o equipamento e utensílio utilizado nos locais de manipulação de alimentos que possam entrar em contato com o alimento devem ser confeccionados de material que: I) não libere substâncias tóxicas, odores e sabores; II) seja não absorvente e resistente à corrosão; III) seja capaz de resistir a repetidas operações de limpeza e desinfecção.

As superfícies devem ser lisas e estarem isentas de rugosidade e frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higiene dos alimentos. Não é recomendável o uso de madeira e de outros materiais que não possam ser limpos e desinfetados adequadamente, a menos que se tenha a certeza de que seu uso não será uma fonte de contaminação. Deve ser evitado o uso de diferentes materiais na mesma superfície para inibir o aparecimento de corrosão por contato (BRASIL,1997).

As características das superfícies auxiliam a realização de um procedimento de higienização adequado (HAYES, 1993). Superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias de superfície, podendo apresentar fissuras ou microfissuras ou fendas com tamanho suficientes para alojar

microrganismos, principalmente bactérias. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização que favorece o crescimento microbiano e o desenvolvimento de microrganismos (BOWER et al, 1996). A rugosidade dos materiais também influencia na formação do biofilme (TAYLOR e HOLAH, 1996), mas parece ser menos importante em relação à adesão inicial (BOULANGE-PETERMANN et al, 1998). Esse fato pode ser relacionado à superfície de contato entre microrganismos e superfícies que processa o alimento. Em geral, quanto maior a superfície de contato maior a probabilidade de formação de biofilme, uma vez que maior é a força inicial de adesão. Contudo, nem sempre quanto maior a rugosidade maior será a adesão inicial. A influência da rugosidade da superfície no processo de formação de biofilme é relacionada às dificuldades durante higienização de superfícies rugosas. Equipamentos processadores de alimentos são fontes potenciais de microrganismos patogênicos (MIDELET e CARPENTIER, 2004). Haeghebaert et al, (2002) constataram que a contaminação de equipamentos contribuiu com 59 % dos surtos de doenças de origem alimentar investigadas na França durante o ano de 2001. Conseqüentemente, é importante melhorar o conhecimento dos fatores envolvidos na transferência de microrganismos de equipamentos para os alimentos, especialmente durante o contato.

A facilidade de higienização de superfícies, além de suas propriedades anticorrosivas e mecânicas, tem sido um dos argumentos decisivos na escolha de materiais para equipamentos da linha de processamento (JULLIEN et al, 2002).

Os materiais das superfícies comumente usados no processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro, permitem o crescimento microbiano, que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes (RODOLFO JR e NUNES, 2002; LEJEUNE, 2003).

As superfícies de processamento devem ser inertes, tanto no que se refere aos alimentos quanto ao que concerne a detergentes e sanitizantes sob condições normais de uso. Além disso, seus componentes não devem ser tóxicos, não podem migrar nem ser absorvidos pelos alimentos. As superfícies lisas, duras, contínuas sem fendas ou fissuras são as mais indicadas. As características macroscópicas e particularmente microscópicas das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na

contaminação dos alimentos com microrganismos deterioradores ou patogênicos. As características das superfícies auxiliam na realização de um procedimento de higienização adequado, sendo que quanto mais lisa a superfície, mais fácil será a higienização. O ideal é que nas superfícies não se formem poros nem ranhuras, e que estas sejam resistentes às deformações, como o abaulamento. (ANDRADE et al, 2008).

Dentre os materiais disponíveis, o aço inoxidável, uma liga cuja composição inclui carbono, cromo e níquel, é o mais utilizado. Há diversos tipos de aço inoxidável, mas os que contêm 18 % de cromo e 8 % de níquel são os mais usados. Neste grupo, estão as ligas da classe 300, por exemplo, 304 e 316, que são resistentes à corrosão causada pela maioria dos alimentos, detergentes e sanitizantes, além de serem facilmente higienizáveis e relativamente baratas. Esta superfície é comumente usada na construção de equipamentos e utensílios de processamento de alimentos em geral, como: tanques de fabricação e estocagem, trocadores de calor, silos, tachos, tubulações, mesas, pias, bancadas para manuseio, entre outras aplicações (JULLIEN et al, 2002).

Superfícies de aço inoxidável e vidro são de mais fácil limpeza do que polímeros, alumínio e cobre (BOULANGE-PETERMANN, 1996). Segundo Boulange-Petermann (1996), este material é relativamente mais resistente ao ataque de agentes oxidantes e outros agentes sanitizantes usados na indústria de alimentos, como hipoclorito de sódio, ácido peracético e iodóforos. Entretanto, a microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, que permitem a proteção das células bacterianas contra as forças exercidas pelo escoamento do alimento (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Os polímeros são amplamente utilizados na indústria de alimentos em função de suas excelentes propriedades, pois são capazes de retardar e prevenir mudanças e deterioração no material de embalagem em função de influências externas, como a presença de oxigênio, de luz e de microrganismos. Uma grande vantagem é o seu menor custo em relação a outros materiais usados para embalagem como, por exemplo, o vidro (VERGNAUD, 1998).

As propriedades dos polímeros variam bastante, de acordo com a matéria-prima utilizada, dos aditivos incorporados e do método de fabricação. Aqueles usados na indústria de alimentos são agrupados em duas categorias: termoplásticos e termoestáveis. Os termoplásticos amolecem quando são aquecidos e endurecem quando resfriados, processo

que pode ser repetido várias vezes sem mudanças químicas apreciáveis. Os termoplásticos mais comumente encontrados em indústrias de alimentos são: polietileno, polipropileno, poli (cloreto de vinila) ou PVC, acrílico, entre outros. Os termoestáveis são capazes de endurecer na primeira vez que são aquecidos, mas se forem reaquecidos pode ocorrer degradação química. Poliéster, resinas epóxi e poliuretanos são polímeros termoestáveis usados como componentes de equipamentos usados no processamento de alimentos (HAYES, 1993; RODOLFO JR. et al, 2002).

Algumas superfícies consideradas não convencionais são usadas no processamento de alimentos. Dentre elas, destacam-se a fibra de vidro, o poliuretano, o PVC, o silicone, o mármore e o granito.

O PVC caracteriza-se por ser atóxico, resistente à maioria dos reagentes químicos, como agentes oxidantes, é impermeável, estável, bom isolante térmico, além de possuir grande durabilidade e não propagar chamas. Pode ser rígido ou flexível, opaco ou transparente, brilhante ou fosco, colorido ou não. Este material pode ser formulado com vários tipos de aditivos, sendo o polímero mais polivalente. Os aditivos empregados podem melhorar as características das superfícies de PVC, como a resistência ao calor ou ao frio, a choques ou à luz, dentre outras. A adição de líquidos orgânicos, denominados plastificantes, confere ao PVC grande flexibilidade (RODOLFO JR. et al, 2002).

O PVC é o único material plástico que não é 100 % derivado do petróleo, uma vez que contém 57 % p/p de cloro, originário do cloreto de sódio, e 43 % p/p de eteno, de origem petrolífera. Dentre as superfícies de PVC envolvidas com alimentos, destacam-se embalagens usadas para acondicionamento, garrafas para água mineral, construção de tanques, tubulações, acessórios e revestimento de correias transportadoras (HAYES, 1993).

2.2.4 Técnicas para determinação da adesão bacteriana

Há um aumento na demanda de novas tecnologias que fornecem uma rápida quantificação de microrganismos. Muitos métodos vêm sendo avaliados, incluindo a microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo e bioluminescência. Apesar do uso de tais métodos há ainda algumas restrições como seletividade, sensibilidade,

reprodutibilidade e custo. Além disso, um desafio é atribuído à necessidade de quantificar bactérias aderidas em superfícies, particularmente quando estão na forma de biofilmes.

Vários métodos são usados para avaliar o processo de adesão. Dentre os vários tipos de microscopia utilizados, pode-se citar a microscopia ótica, a de epifluorescência, a de contraste de fase e eletrônica de varredura e de transmissão, sendo que a escolha do tipo de microscopia a ser utilizada dependerá do aspecto de formação do biofilme que se deseja analisar (ZOTTOLA, 1997).

As técnicas microscópicas são as mais recomendadas para a visualização da adesão bacteriana, crescimento e formação de biofilmes em sistemas de processamento de alimentos, podendo até acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real (PARIZZI, 1999).

A microscopia permite obter informações sobre a morfologia de células e colônias microbianas, distribuição destas colônias na superfície, presença de exopolissacarídeos e natureza dos produtos de corrosão se, por exemplo, são cristalinos ou amorfos. Ela também revela o tipo de ataque por meio de observações das mudanças na microestrutura do metal depois da remoção do biofilme (BEECH, 2004).

A microscopia de contraste de fase também é muito útil nos estudos de adesão microbiana em superfícies. Ela é particularmente recomendada quando se deseja acompanhar o desenvolvimento da formação do biofilme em tempo real, também em uma superfície transparente.

Desde a sua primeira aplicação, há mais de vinte anos, a contagem de bactérias por microscopia de epifluorescência tornou-se uma técnica comumente usada para a estimativa de bactérias em diferentes estados fisiológicos, como dormente, injuriada, estressada, viável mas não cultivável ou morta usando fluorocromos, ou seja, substâncias fluorescentes seletivas (BERNARDEAU, 2001).

Já as técnicas de microscopia eletrônica são as mais indicadas quando se deseja analisar a interação microbiana na matriz do biofilme. De modo geral, as amostras são fixadas usando-se agentes químicos, por exemplo, o glutaraldeído, o paraformaldeído e o ósmio ou crio-fixadas, onde a amostra é rapidamente congelada para evitar os danos às células pelos cristais de gelo (ZOTTOLA, 1997). Dentre as técnicas de microscopia eletrônica incluem-se a de varredura (MEV) e a de transmissão (MET). Uma seqüência

típica de preparação da amostra a ser analisada pela MEV consiste no desenvolvimento de biofilme sobre um “suporte” sólido, como por exemplo, o vidro, o aço inoxidável, a borracha e seguido pela fixação da amostra, dessecação e cobertura com metal. Essas etapas influenciam na qualidade da imagem resultante. Para análises por MET, após desidratação e fixação, uma resina é infiltrada nas amostras, geralmente epóxi ou metacrilato, formando uma cobertura semelhante a um plástico enrijecido em que as amostras são cortadas em um ultramicrotomo, usando um diamante ou lâmina de vidro, numa espessura de aproximadamente 90 nm, que são colocados em grades de cobre, as quais compõem o MET. Geralmente estas grades são revestidas com um fino filme de polímero para auxiliar no suporte dos cortes. Urânio ou chumbo são os metais usados para corar os cortes ultrafinos, desse modo as grades são colocadas em uma coluna e os elétrons transmitidos através da amostra, que pode ser vista por fosforescência (ZOTTOLA, 1997).

A contagem padrão em placas é usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos e de superfícies que entram em contato direto com os mesmos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação (SILVA et al, 1997). Sua presença em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (SIQUEIRA, 1995).

O método de contagem padrão em placas baseia-se na premissa de que cada célula microbiana presente na amostra irá formar, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, uma colônia visível e isolada. Ao variar o tipo de meio de cultura e as condições de incubação é possível selecionar o gênero ou a espécie que se deseja contar. Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos, não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. A relação correta é feita entre o número de colônias e o número de unidades formadoras de colônias (UFC), que podem ser tanto individuais como agrupamentos característicos de certos microrganismos (SILVA et al, 1997).

2.3 Modelagem matemática e validação dos modelos preditivos

A modelagem preditiva foi desenvolvida para auxiliar as técnicas microbiológicas tradicionais. A sobrevivência e/ou crescimento de um microrganismo de preocupação pode ser predito com base na relação matemática entre a resposta do microrganismo e as condições ambientais (MCMEEKIN et al, 1993).

Os modelos matemáticos definidos para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos são mais empíricos do que aqueles utilizados nos processos fermentativos. Nos alimentos, ao contrário do que se observa normalmente nos processos fermentativos, o tipo e concentração de nutrientes não são conhecidos e, em geral, não são limitantes. Além disso, os microrganismos presentes estão inicialmente em pequena quantidade e freqüentemente submetidos a condições sub ótimas (WHITING e BUCHANAN, 1997).

Apesar de empíricos, os modelos matemáticos definidos para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos são baseados em técnicas de regressão linear e não-linear. Como em qualquer aplicação estatística de regressão, suposições quanto à aleatoriedade, normalidade, interpolação dentro da faixa de variação dos fatores testados ao invés de extrapolações, parcimônia e especificações estocásticas devem ser estabelecidas (MCMEEKIN et al, 1993, RATKOWSKY, 1993).

Um grande número de fatores ambientais influencia o crescimento, morte e sobrevivência dos microrganismos. Nos modelos preditivos é desejável incluir todos os fatores que influenciam a resposta bacteriana, mas em muitas situações isto não é prático. Para o desenvolvimento de um modelo preditivo apropriado é necessário incluir, como variáveis independentes, os fatores que podem ser medidos e são relevantes para o alimento e para as condições encontradas no local de produção (MELLEFONT et al, 2003).

Esta etapa envolve a análise dos dados para produzir o modelo e posterior validação matemática do ajuste dos dados ao modelo (BLACKBURN, 2000). A escolha de uma função para descrever uma determinada resposta é um exercício estatístico, em contraste, o ajuste da função escolhida aos dados experimentais é mais um exercício de álgebra, e consiste na determinação dos valores dos parâmetros que melhor ajustam o modelo escolhido ao conjunto de dados coletados. O processo de ajuste de uma função está baseado no princípio dos mínimos quadrados (MCMEEKIN et al, 1993).

O sucesso da aplicação da modelagem preditiva depende do desenvolvimento do modelo apropriado, mas antes de sua aplicação na indústria é necessária a validação do modelo usando-se condições que não foram usadas na sua dedução. É geralmente aceito que a comparação das respostas predita e observada pode avaliar a eficiência do modelo preditivo (MELLEFONT et al, 2003).

Realiza-se a validação do modelo preditivo por meio de procedimentos estatísticos para verificar se o modelo encontrado descreve bem os dados experimentais (MCCLURE et al, 1994). Independente do quanto um modelo se ajusta ao conjunto de dados que o gerou, o seu valor real está baseado no quão bem ele pode prever a variável de resposta, sob condições não testadas especificamente para derivá-lo. Ou seja, o valor real de um modelo está baseado no quão bem ele trabalha no mundo real. Sendo assim, o último teste de qualquer modelo é avaliar sua habilidade em prever respostas a novas situações. Em microbiologia de alimentos, isto significa comparar os dados de comportamento do microrganismo de interesse, em alimentos submetidos a condições reais de estocagem e distribuição, com valores previstos pelo modelo ajustado (MCMEEKIN et al, 1993).

2.3.1 Modelos de primeiro nível

São modelos que descrevem mudanças nos números de microrganismos em função do tempo (BLACKBURN, 2000).

Os modelos de primeiro nível quantificam o aumento de biomassa microbiana como unidades formadoras de colônia por mililitro ou absorvância; alternativamente, isso pode ser verificado pelas mudanças na composição do meio como produtos finais metabólicos, condutividade e produção de toxinas. Cada curva de população versus tempo pode ser descrita por um grupo de valores específicos para o cálculo dos parâmetros do modelo (FORSYTHE, 2002).

Alguns exemplos de modelos primários incluem o modelo de Gompertz (GIBSON et al, 1987; BUCHANAN, 1993), modelos linear e não linear de inativação térmica (ABRAHAM et al, 1990), modelos de sobrevivência e inativação (KAMAU et al, 1990), valores da taxa de crescimento (MCMEEKIN et al, 1987) e o modelo de Baranyi (BARANYI e ROBERTS, 1994).

2.3.2 Modelos de segundo nível

Os modelos de segundo nível são, comumente, utilizados para descrever as respostas às mudanças dos fatores ambientais, por exemplo, temperatura, pH e A_a . Existem três tipos de modelos: a equação de superfície de resposta de segunda ordem, o modelo de raiz quadrada (Belehardek) e as relações de Arrhenius (FORSYTHE, 2002).

A equação de Arrhenius é aplicada se a taxa de crescimento é determinada por meio de uma reação enzimática simples de taxa limitada. Broughall et al (1983) utilizaram a equação de Arrhenius para descrever o tempo da fase lag e de geração do *S. aureus* e da *S. typhimurium*. Mais tarde, esse modelo foi modificado com o objetivo de considerar os valores de pH (BROUGHALL e BROWN, 1984). Inicialmente, a equação de superfície de resposta foi utilizada quando determinados fatores afetavam o modelo de nível primário.

O modelo de raiz quadrada (SKINNER e LERKIN, 1994) é baseado na relação linear entre a raiz quadrada da taxa de crescimento e a temperatura. Este modelo ainda assume que os fatores ambientais são independentes, ou seja, que não existe interação entre os fatores.

As equações de regressão polinomial não assumem nenhuma relação mecânica entre a variável dependente e a variável independente, neste caso a equação resultante representará o melhor ajuste a um conjunto de dados em particular. Quanto mais complexa a equação com interações e termos quadráticos, melhor será o ajuste da equação aos dados de origem (WHITING e BUCHANAN, 1997).

2.3.3 Modelos de terceiro nível

Os modelos de terceiro nível utilizam os de primeiro e segundo nível com a finalidade de gerar modelos para calcular a resposta microbiana às mudanças de condições e para comparar os efeitos dessas diferentes condições (FORSYTHE, 2002).

Os programas Food Micromodel (Leatherhead Food Research Association, Surrey, U.K) e o Pathogen Modeling Program (U.S. Department of Agriculture, Wyndmoor, Pa, UDA) são exemplos de modelos de terceiro nível. Esses programas incluem modelos

definidos a partir de condições constantes do meio ambiente (WHITING e BUCHANAN, 1997).

2.3.4 Validação matemática

A validação matemática é realizada via procedimentos de quantificação para verificar se o modelo encontrado descreve bem os dados experimentais (MCCLURE et al., 1994). É importante que o modelo preditivo tenha significado biológico. Há um número de fontes de variabilidade que podem ser inerentes ao microrganismo, a erros sistemáticos devido aos métodos analíticos de laboratório e às técnicas de modelagem impróprias em descrever inadequadamente os dados (BLACKBURN, 2000). Estima-se, que para modelos gerados utilizando meios de laboratório, o erro relativo na predição de taxas de crescimento específicas é de 7 % a 10 %, para modelos primários e de 20 % a 50 % para modelos secundários. Neste ponto existe um grau de aceitação ou rejeição do modelo e novos dados microbiológicos podem ser requeridos ou até mesmo o uso de uma técnica de modelagem mais apropriada. Ross (1996) introduziu dois índices de validação: o fator bias e o fator exatidão, que depois foram modificados e generalizados por Baranyi et al (1999) para quantificar a confiança nas predições do modelo.

A adequação do modelo para prever os dados pode ser determinada também graficamente com base em índices estatísticos e matemáticos (GIFFEL e ZWIETERING, 1999).

2.3.4.1 Fator bias

Este fator, segundo Ross (1996), indica se a média dos valores observados encontra-se acima ou abaixo da linha de equivalência. Em outras palavras, permite avaliar com o mesmo peso, em média, tanto os valores preditos que sobreestimam como os que subestimam os valores observados. A equação 1 representa o cálculo do fator bias.

$$fb = 10^{(\sum \log(P/O)/n)} \quad (1)$$

em que N é o número de dados; P é o valor calculado ou predito; e O é o valor experimental ou observado.

Quando o valor desse fator é maior do que 1 indica que o modelo sobreestima as observações, sendo as predições falhas do lado perigoso (“fail-dangerous”). Já quando esse valor é menor do que 1 indica que o modelo é seguro (“fail-safe”) (ROSS et al, 2000a; JEYAMKONDAN et al, 2001).

2.3.4.2 Fator exatidão

O fator exatidão calcula a média da distância entre cada ponto e a linha de equivalência como uma medida de quão próximas, da média, as predições estão das observações (ROSS, 1996). A equação 2 apresenta o cálculo do fator exatidão.

$$fe = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log \left(\frac{\text{predito}}{\text{observado}} \right) \right|}{n} \right)} \quad (2)$$

Este índice estatístico é sempre maior do que 1. Quanto maior é o fator exatidão, menos exato será o modelo. Ele é especialmente útil em casos de comparação de modelos que têm outros parâmetros de validação semelhantes.

2.3.5 Modelo de superfície de resposta

Modelos polinomiais representam aproximações puramente empíricas da variável resposta às variáveis independentes. Em microbiologia preditiva o modelo é construído na forma de um polinômio que pode relacionar parâmetros de crescimento e, ou morte microbiana em função de variáveis individuais e independentes, tais como temperatura, pH, A_w , etc. Uma regressão linear múltipla pode ser usada para determinar o melhor ajuste de seus parâmetros à variável resposta (ROSS e MCMEEKIN, 1994). A equação 3 representa a equação geral de regressão:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

em que Y é o logaritmo das UFC por centímetro quadrado; $b_0, b_1, b_2 \dots b_{ij}$ são parâmetros a serem estimados; $X_1, X_2 \dots X_{ij}$ são as variáveis estudadas.

2.3.6 Coeficiente de determinação ou coeficiente de regressão

O coeficiente de determinação (R^2) é usado como uma medida da predição alcançada. Ele mede a proporção do modelo que é explicada pela regressão. Para um valor de R^2 ($0 < R^2 < 1$) bem próximo de 1, melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas (GRAU e VANDERLINDE, 1993).

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Avaliação da formação de biofilmes por *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895)

2.4.1.1 Delineamento experimental

As análises de variância foram realizadas para todas as características avaliadas a 5 % de probabilidade utilizando-se o sistema para análises estatísticas SAEG. As superfícies e os tempos de contato foram testados com base no teste de Scott-Knott.

2.4.1.2 Superfícies avaliadas

Para a avaliação da adesão bacteriana foram selecionados três tipos de superfícies usadas no processamento de alimentos em indústrias, restaurantes industriais e cozinhas domésticas. Assim, foram avaliados cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 (AIN), poli (cloreto de vinila) (PVC) revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}) e PVC revestimento fino com tecido (PVF_{RF}).

As dimensões de cada cupom variaram de acordo com cada tipo de superfície (Tabela 1).

Tabela 1: Dimensões dos cupons das superfícies usados para a adesão de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895).

Superfície	Dimensões (mm)		
	L	C	E
AIN	10	10	1
PVC _{RG}	10	10	3
PVC _{RF}	10	10	2

L = Largura; C = Comprimento; E = Espessura.

AIN = Aço inoxidável 304 # 4; PVC_{RG} = PVC revestimento grosso com tecido; PVC_{RF} = PVC revestimento fino com tecido.

2.4.1.3 Microrganismo, preparo dos cupons e prova de adesão

Foi utilizada uma cultura de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A preparação dos cupons para análise deu-se por limpeza por meio de escovação empregando-se água e detergente neutro líquido, enxague com água destilada e posterior imersão em álcool etílico 70 %, por 1 hora para remoção da gordura, seguiu-se novo enxague com água destilada e secagem ao ar. Os cupons foram expostos à luz ultravioleta (254 nm), por 1 hora para sanitização (PARIZZI, 1999).

Os cupons foram imersos, a temperatura ambiente, em frascos contendo 100 mL de caldo nutriente (Oxoid) acrescido de um volume de suspensão de células de *E. coli* O157:H7, de forma a obter-se uma contagem de 10^3 UFC.mL⁻¹. Para isso, ativou-se a estirpe de *E. coli* O157:H7 em caldo nutriente e incubou-se a 37 °C, por 24 horas por dois dias consecutivos, onde a contagem atingiu 10^8 UFC.mL⁻¹. Para alcançar a contagem desejada, transferiu-se 1 mL dessa suspensão para um tubo contendo 9 mL de água peptonada, alcançando-se a diluição 10^7 UFC.mL⁻¹. Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes, de modo a se obter uma contagem de 10^5 UFC.mL⁻¹. Então, transferiu-se 1 mL desta para um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo nutriente, obtendo-se uma contagem de 10^3 UFC.mL⁻¹, o qual foi confirmado por plaqueamento em Ágar MacConkey (Acumedia). Os cupons devidamente esterilizados foram imersos nesse erlenmeyer com auxílio de uma pinça esterilizada e, então, incubados a 37 °C. As avaliações da quantidade de células aderidas por centímetro quadrado foram realizadas após 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e

10 h de tempo de contato, em cada superfície. Em cada tempo foram retirados 2 cupons para cada superfície avaliada, totalizando-se 36 cupons. O tempo zero correspondeu à análise realizada imediatamente após a imersão dos cupons no frasco contendo o meio de cultura e a suspensão bacteriana. Após 10 h de incubação foi determinada a concentração da suspensão. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4.1.4 Contagem padrão em placas

A adesão bacteriana foi avaliada pela técnica da contagem padrão em placas (CPP), onde os cupons foram retirados da suspensão de bactérias em caldo nutriente com auxílio de uma pinça esterilizada e imersos separadamente em 10 mL de água peptonada a 0,1 % por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos contendo 5 mL da mesma solução diluente e submetidos ao vórtex, durante 1 minuto para a remoção das células sésseis (PARIZZI, 1999). Diluições apropriadas foram preparadas e transferidas para placas de Petri, nas quais se adicionou o meio de crescimento Ágar MacConkey e incubou-se a 37 °C, por 24 horas, procedendo-se em seguida a contagem. Cada colônia contada na placa era equivalente a $2,5 \times 10^0$ UFC.cm⁻² que foi calculado relacionando-se o volume do diluente usado para rinsagem (5 mL), a alíquota usada no plaqueamento (1 mL), a média da contagem expressa em UFC obtida nas placas (M), a diluição realizada (D) e a área do cupom (2 cm²), conforme a equação 4 (CARELI, 2005). Assim, tem-se:

$$Y = \frac{\left(\frac{5}{1}\right) \cdot M \cdot D}{2} = 2,5 \cdot M \cdot D \quad (4)$$

2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias das superfícies submetidas à adesão bacteriana foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura com o intuito de verificar as diferenças entre as microtopografias e visualizar a adesão bacteriana.

O preparo das amostras para observação em microscopia eletrônica de varredura foi realizado segundo metodologia descrita por Silveira (1989). Os cupons previamente submetidos à adesão bacteriana foram imersos em água peptonada 0,1 % por cinco vezes consecutivas, por 10 minutos para rinsagem do material. Para fixação das bactérias aderidas foram utilizados solução de glutaraldeído 2,5 % e tampão fosfato 0,1 M (1:1 v/v). Os cupons foram lavados em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ e água destilada (1:1 v/v). O procedimento de desidratação foi realizado utilizando-se álcool etílico P.A. nas concentrações de 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 %, respectivamente, com 10 minutos de contato em cada concentração e 100 % em três repetições, por 10 minutos para retirada completa da água. Os cupons foram transferidos para cestas permeáveis usadas no Secador de Ponto Crítico (“Critical Point Dryer”) Balzers CPD 020, utilizando-se gás carbônico. Após a secagem do material, fitas adesivas foram coladas no suporte do porta-amostras do microscópio (“stub”) e aplicou-se uma camada de prata coloidal líquida para melhorar a condutividade elétrica do material. Em seguida, os cupons foram colocados no “stub” e levados no Metalizador Balzers Union FDU 010, sendo submetidos ao processo de metalização com uma fina camada de ouro de 20 nm, evaporada a vácuo, também com a finalidade de torná-los bons condutores elétricos. Posteriormente, os cupons foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 1430 VP, com aumentos de 800 X a 4500 X.

2.4.3 Modelar e avaliar matematicamente a formação de biofilmes

2.4.3.1 Planejamento experimental

O efeito na adesão e na formação de biofilmes também foi estudado usando-se a metodologia de superfície de resposta por meio da implementação de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para dois fatores, temperatura de exposição e tempo de incubação. As respostas foram ajustadas por regressão linear utilizando-se o modelo polinomial quadrático descrito na equação 5:

$$Y = b_0 + b_1 T + b_2 T^2 + b_3 t + b_4 t^2 + b_5 T \cdot t \quad (5)$$

em que Y ($\log \text{UFC.cm}^2$) é a resposta; T ($^{\circ}\text{C}$) é a temperatura; t (horas) é o tempo de contato; b_0 a b_5 são os coeficientes do modelo.

A faixa de condições, sobre as quais o modelo tem que operar foi definida, pois os modelos empíricos não são aplicados além da faixa definida na qual o modelo foi gerado. Nessas condições é requerido que os fatores de crescimento possam ser alterados facilmente. Embora a heterogeneidade de muitos alimentos os torne difícil para geração de dados, existem alguns particularmente homogêneos como o leite, que podem ser utilizados.

A preparação dos cupons foi realizada da mesma forma descrita anteriormente, ou seja, os cupons-teste das superfícies avaliadas foram imersos em erlenmeyer contendo 100 mL de caldo nutriente acrescido de um volume de suspensão de *E. coli* O157:H7, de forma a obter uma contagem de 10^3 UFC.mL^{-1} . A formação do biofilme bacteriano foi realizada nas temperaturas de 12 $^{\circ}\text{C}$, 17 $^{\circ}\text{C}$, 28 $^{\circ}\text{C}$, 39 $^{\circ}\text{C}$ e 44 $^{\circ}\text{C}$ com avaliações da quantidade de células por centímetro quadrado após 0 h, 7 h, 24 h, 41 h e 48 horas de contato, sob as mesmas superfícies.

Em cada tempo de contato foram retirados do erlenmeyer dois cupons para avaliação destinados a contagem padrão em placas. As análises foram realizadas com três repetições.

A análise dos resultados foi realizada segundo o DCCR composto de uma combinação de 2^2 com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, conforme proposto por Barros Neto et al (2003) (Tabela 2). As repetições no ponto central tiveram como finalidades fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista. O tempo zero correspondeu à análise realizada imediatamente após a imersão dos cupons no frasco contendo o meio de cultura e a suspensão bacteriana.

Para o procedimento de análise de experimentos utilizou-se o programa computacional “MINITAB^R”. Os modelos encontrados foram validados estatisticamente por meio de análise de variância. O fator bias e exatidão também foram calculados como descrito por Ross (1996).

Tabela 2: Matriz do delineamento composto central rotacional

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (dias)
1	17	7
2	17	41
3	39	41
4	39	7
5	12	24
6	44	24
7	28	0
8	28	48
9	28	24
10	28	24
11	28	24

A temperatura variou de 12 °C a 44 °C , pelo fato de que *E. coli* O157:H7, apesar de ser um microrganismo mesófilo, é capaz de se desenvolver também nessa faixa de temperatura.

O tempo de contato variou de 0 a 48 horas, com o objetivo de permitir a avaliação da formação do biofilme, pois a consolidação e o subsequente aumento da população na superfície do biofilme são dependentes do tempo e o crescimento da maioria dos microrganismos seria retardado a baixas temperaturas (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000).

2.5 RESULTADOS E DISCUSÃO

2.5.1 Adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em diferentes superfícies de processamento pela contagem padrão em placas

Constatou-se que o número de UFC.cm⁻² de *E. coli* O157:H7 diferiu ($p < 0,05$) em função do tipo de superfície e do tempo de contato. Além disso, foram observadas diferenças ($p < 0,05$) nesse número ao avaliar as interações entre tempo de contato e superfície sobre a adesão.

Observou-se que o número de células aderidas aumentou com o tempo de contato para as três superfícies avaliadas (Figura 2). A concentração inicial da suspensão no meio de subcultivo aumentou com o tempo de incubação. Após 10 h de incubação, a suspensão atingiu uma concentração aproximada de 10^8 UFC.mL⁻¹. Verificou-se também que para um mesmo tempo de contato a adesão em aço inoxidável foi menor do que a observada nas duas superfícies de PVC (Figura 2).

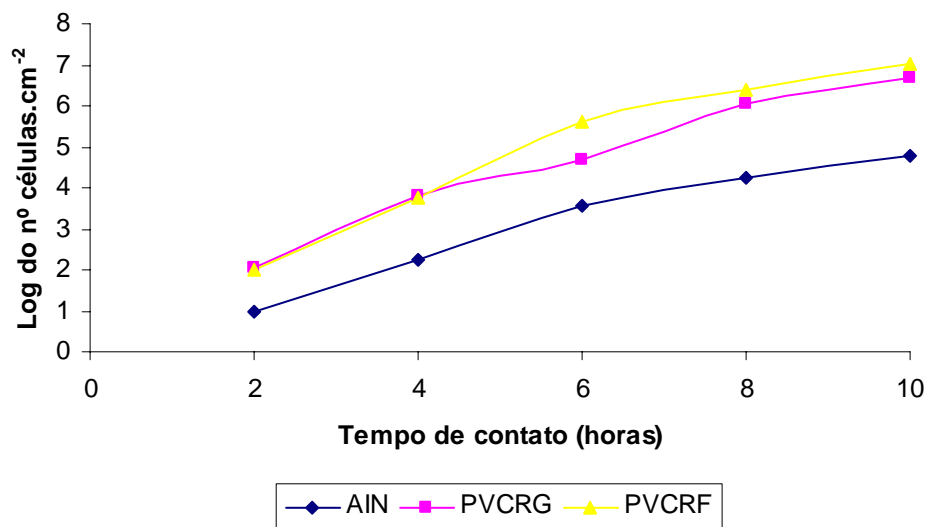


Figura 2: Número de células de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), aderidas em aço inoxidável 304 # 4 (AIN), PVC revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}) e PVC revestimento fino com tecido (PVC_{RF}) durante o cultivo em caldo nutriente a 37 °C.

Observou-se pelo teste de Scott-Knott que não houve diferença significativa na adesão do microrganismo ($p > 0,05$) no aço inoxidável e no PVC_{RF} para os tempos 2 e 4 horas de contato. Nos tempos de contato iguais e superiores a 6 horas houve diferença significativa na intensidade de adesão nessas duas superfícies avaliadas. Avaliando-se cada superfície ao longo dos diferentes tempos de contato, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na adesão do microrganismo (Tabela 3).

Tabela 3: Médias da adesão de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), expressas em log UFC.cm⁻², em três tipos de superfícies usadas no processamento de alimentos nos tempos de contatos de 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 10 h, avaliadas pela técnica da contagem padrão em placas durante o cultivo em caldo nutriente e a 37 °C.

Superfície	Tempo de contato				
	2	4	6	8	10
AIN	0,96bA	2,26bB	3,55cC	4,26cD	4,78cE
PVC _{RG}	2,03aA	3,81aB	4,68aC	6,06aD	6,67aE
PVC _{RF}	1,99aA	3,75aB	5,62bC	6,39bD	7,04bE

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha (tempo de contato) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna (superfície) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

AIN = Aço inoxidável 304 # 4 (AIN); PVC_{RG} = PVC revestimento grosso com tecido; PVC_{RF} = PVC revestimento fino com tecido.

A menor adesão ocorreu no aço inoxidável e a maior no PVC_{RF} obtendo-se respectivamente 4,78 log UFC.cm⁻² e 7,04 log UFC.cm⁻² após 10 h de contato (Tabela 3).

Ronner e Wong (1993) consideraram como biofilme um número de 10³ células aderidas por centímetro quadrado. Assim, segundo esses autores na superfície de aço inoxidável formou-se biofilme após um tempo de contato de 6 horas, enquanto para as superfícies de PVC observou-se a formação de biofilme em apenas 4 horas de tempo de contato. Wirtanen et al (1996) e Andrade et al (1998b) afirmaram ser necessária uma população de células de 10⁵ e 10⁷ células por cm², respectivamente. Então, de acordo com Wirtanen et al (1996) na superfície de aço inoxidável não foi formado biofilme com 10 horas de contato, porém para as duas superfícies de PVC houve a formação de biofilmes com 8 horas de tempo de contato.

Pela Figura 2 foi possível observar que a bactéria apresentou uma maior adesão entre 2 e 6 horas de tempo de contato. Isto pode ser explicado pelo fato de que muitas bactérias Gram-negativas regulam a expressão de alguns genes em resposta à densidade populacional por meio de N-acil-homoserinas lactonas em um mecanismo chamado “quorum sensing”. Além disso, *E. coli* O157:H7 possui um outro sinal regulatório global, chamado de autoindutor 2 (furanosil borato diéster) que regula mais de 400 genes, mostrando a possível relação do “quorum sensing” com a etapa inicial de formação do biofilme (VIANA, 2006). Esses dados mostram a importância dos procedimentos de higienização nas superfícies que entram em contato com alimentos, pois se constatou que a formação de biofilmes pode ocorrer em um curto espaço de tempo, o que mostra a necessidade de se realizar uma boa higienização nas superfícies e equipamentos ao longo do processamento do alimento.

Zaqueus et al (2000) constataram que a formação de biofilme bacteriano em superfícies de PVC, polietileno e aço inoxidável expostos à água ozonizada foram muito similares. Entretanto, o número de células aderidas foi um pouco mais alto em PVC do que em polietileno.

2.5.2 Avaliação da adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em diferentes superfícies de processamento por microscopia eletrônica de varredura

Foram obtidas fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de cada superfície submetida ao procedimento de adesão bacteriana (Figura 3). Na observação microscópica verificou-se que a superfície de aço inoxidável apresentou características microtopográficas muito diferentes em relação às demais superfícies, o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão constatados nesse experimento. Segundo Ryu e Beuchat (2005) os EPS produzidos por *E. coli* O157:H7 agem como um anti-aderente, afetando a união das células sob superfícies de aço inoxidável.

No entanto, outros fatores podem estar envolvidos com os mecanismos de adesão, como características do microrganismo, do material aderente e do meio que envolve o microrganismo (TROLLER, 1993). A espécie, o meio de cultura, a idade da cultura e a concentração do microrganismo podem afetar o processo de adesão. Quanto ao material aderente, tanto o tipo, a forma iônica, quanto o tamanho da partícula são importantes no processo de adesão. Além disso, outros fatores como pH, concentração de sais orgânicos, compostos orgânicos, agitação, tempo e temperatura de contato são importantes nesse processo (TROLLER, 1993).

Todas as imperfeições encontradas podem diminuir a eficiência dos procedimentos de higienização e facilitar a penetração de resíduos de alimentos que servirão de substrato para a adesão bacteriana, crescimento e, conseqüentemente, formação de biofilmes. Algumas imperfeições apresentam tamanhos suficientes para alojar e proteger as células microbianas (HOLT et al, 1994).

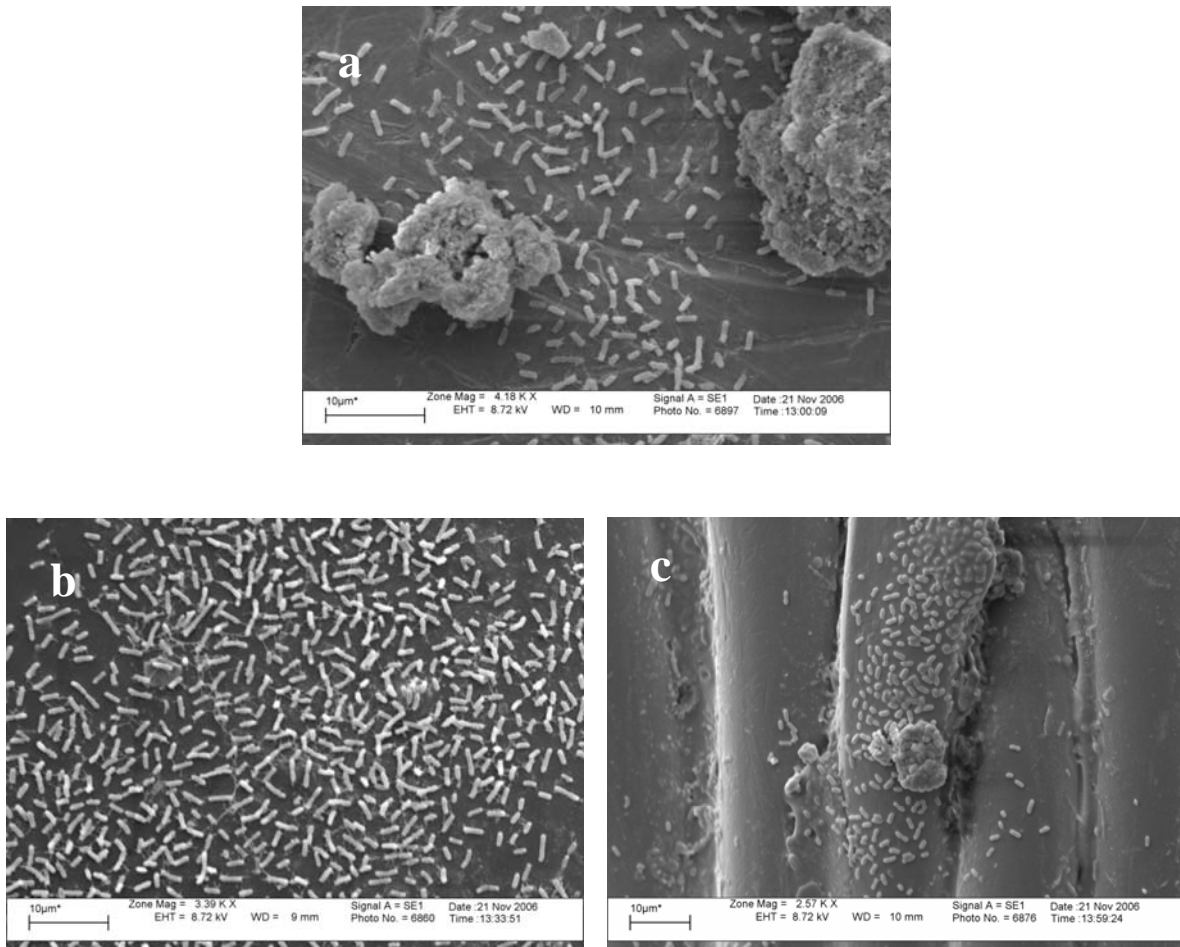


Figura 3: Fotomicrografia de *E. coli* O157:H7 aderida na temperatura de 37 °C e no tempo de contato de 10 horas. a) aço inoxidável 304 # 4 (AIN); b) PVC revestimento grosso com tecido (PVC_{RG}); c) PVC revestimento fino com tecido (PVC_{RF}).

2.5.3 Avaliação da adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em diferentes superfícies de processamento por implementação de um desenho composto central rotacional

Os resultados, média de três repetições, da adesão de *Escherichia coli* O157:H7 nas superfícies de aço inoxidável, PVC_{RG} e PVC_{RF} em função da temperatura de exposição e do tempo de incubação são mostrados na Tabela 4. Nota-se que o grau de adesão variou de acordo com o tipo de superfície, o tempo de exposição e a temperatura de incubação.

Tabela 4: Médias de contagem de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) aderidas em três tipos de superfícies usadas no processamento de alimentos, avaliadas pela técnica da contagem padrão em placas.

Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Aço inoxidável	PVC _{RG}	PVC _{RF}
12	24	$7,8 \times 10^1$	$5,4 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$
17	7	$3,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$
17	41	$1,3 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
28	0	$2,0 \times 10^0$	$2,0 \times 10^0$	$2,0 \times 10^0$
28	24	$6,0 \times 10^5$	$8,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
28	24	$8,5 \times 10^5$	$9,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
28	24	$3,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$9,8 \times 10^6$
28	48	$2,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
39	7	$3,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
39	41	$3,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$
44	24	$1,3 \times 10^5$	$5,5 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$

Os resultados da adesão de *E. coli* O157:H7 nas três superfícies avaliadas em função do tempo e temperatura e sua interação foram ajustados aos dados experimentais por meio da análise de superfície de resposta, utilizando-se o modelo polinomial quadrático descrito na Eq. 5.

A Tabela 5 mostra o resultado da análise de regressão para a adesão de *E. coli* O157:H7 nas três superfícies avaliadas. Para a adesão em aço inoxidável e em PVC_{RF} foi observado que as variáveis tempo e temperatura foram significativas ($p < 0,05$) tanto no modelo linear quanto no modelo quadrático. Observou-se também que neste nível de significância não houve interação entre os fatores. Para a adesão em PVC_{RG} observou-se que ambas as variáveis foram significativas ($p < 0,05$) e que houve interação entre os fatores. Os modelos com os coeficientes significativos que representam a adesão de *E. coli* O157:H7 nas superfícies de aço inoxidável, PVC_{RG} e PVC_{RF} em função do tempo e temperatura de exposição foram estabelecidos por meio da regressão linear e, são mostrados, nas Equações 6, 7 e 8, respectivamente.

$$y = -6,6024 + 0,4380T - 0,0049T^2 + 0,2879t - 0,0021t^2 - 0,0031T \cdot t \quad (6)$$

$$y = -6,9062 + 0,4504T - 0,0048T^2 + 0,4223t - 0,0043t^2 - 0,0038T \cdot t \quad (7)$$

$$y = -6,6181 + 0,4501T - 0,0051T^2 + 0,3903t - 0,0044t^2 - 0,0026T \cdot t \quad (8)$$

Com base na equação polinomial quadrática dos modelos de superfície de resposta obtidos (Eq. 6, 7 e 8), o efeito das variáveis independentes (tempo e temperatura) sobre a adesão ($\log \text{UFC.cm}^2$) foram analisados.

Nota-se que o tempo foi o fator mais importante para as três superfícies avaliadas ($p < 0,05$). O tempo teve um efeito linear positivo sobre a resposta para os três casos analisados, o que significa que a adesão tende a aumentar quando o tempo aumenta. Além disso, os coeficientes dos termos lineares são todos positivos, o que significa que aumentando os níveis de todos os fatores deve-se obter maior adesão. Por outro lado, como os coeficientes dos termos quadráticos são todos negativos, a própria elevação do nível dos fatores também tenderá a diminuir a adesão, e na proporção do quadrado da variação.

A Tabela 6 mostra o resultado da análise de variância (ANOVA) do ajuste do modelo para a adesão de *E. coli* O157:H7 nas superfícies de aço inoxidável, PVC_{RG} e PVC_{RF} em função da temperatura de exposição e do tempo de incubação.

De acordo com a análise de variância a regressão foi significativa para a adesão nas três superfícies avaliadas. Apesar de a regressão ter sido significativa para os três casos mostrados na Tabela 6, há uma clara indicação de que houve falta de ajuste do modelo, pois o valor de F calculado para o F tabelado do ajuste foi muito elevado. O valor de F tabelado $F_{3,24} = 3,01$. Outra evidência da falta de ajuste é o baixo valor de p nos três casos estudados. Isto pode ser explicado pelo fato de que avaliar as respostas dos microrganismos frente a fatores do meio pode ser dificultoso quando mais de uma variável é estudada, uma vez que o crescimento microbiano geralmente não é linear e o comportamento bacteriano pode mudar sobre condições diferentes.

Tabela 5: Resultado da análise de regressão do modelo, equações 6, 7 e 8, para as superfícies em aço inoxidável, PVC_{RG} e PVC_{RF}.

Termo	Aço Inoxidável				PVC _{RG}				PVC _{RF}			
	Coefficiente	SE	T	P	Coefficiente	SE	T	P	Coefficiente	SE	T	P
Constante	-6,60248	2,26280	-2,918	0,007*	-6,90625	2,05201	-3,366	0,002*	-6,61818	2,15821	3,067	0,005*
T	0,43808	0,13796	3,176	0,004*	0,45045	0,12511	3,601	0,001*	0,45018	0,13158	3,421	0,002*
t	0,28796	0,07239	3,978	0,000*	0,42237	0,06565	6,434	0,000*	0,39035	0,06905	5,653	0,000*
T*T	-0,00496	0,00230	-2,156	0,040*	-0,00488	0,00209	-2,339	0,027*	-0,00511	0,00219	-2,329	0,028*
t*t	-0,00214	0,00101	-2,116	0,044*	-0,00432	0,00092	-4,707	0,000*	-0,00448	0,00097	-4,642	0,000*
T*t	-0,00312	0,00185	-1,691	0,102**	-0,00382	0,00167	-2,281	0,031*	-0,00262	0,00176	-1,489	0,148**

* - significativo ($p < 0,05$)

** - não significativo ($p > 0,05$)

Tabela 6: Resultado da análise de variância do ajuste do modelo, equações 6, 7 e 8, para as superfícies em aço inoxidável, PVC_{RG} e PVC_{RF}.

Fonte	Aço Inoxidável					PVC _{RG}				PVC _{RF}			
	GL	SQ	QM	F	P	SQ	QM	F	P	SQ	QM	F	P
Regressão	5	102,055	20,411	14,27*	0,000	135,923	27,185	23,11*	0,000	134,488	26,897	20,67*	0,000
Linear	2	87,967	13,276	9,28	0,001	102,686	24,919	21,18	0,000	102,376	21,655	16,64	0,000
Quadrático	2	9,997	4,998	3,49	0,045	27,116	13,558	11,52	0,000	29,227	14,613	11,23	0,000
Interação	1	4,091	4,090	2,86	0,102	6,120	6,120	5,20	0,031	2,885	2,884	2,22	
Resíduo	27	38,628	1,430			31,767	1,176			35,140	1,301		
Falta Ajuste	3	29,513	9,837	25,90	0,000	28,727	9,575	75,59	0,000	31,685	10,561	73,37	0,148
Erro Puro	24	9,116	0,379			3,040	0,126			3,455	0,143		0,000
TOTAL	32	140,68				167,690				169,628			

* - significativo ($p < 0,05$)

Na Tabela 7, primeira coluna, é mostrado o valor do coeficiente de determinação R^2 para o ajuste do modelo para a adesão nas superfícies estudadas.

Tabela 7: coeficiente de determinação para as superfícies em aço inoxidável, PVC_{RG} e PVC_{RF}.

Superfície	Variação explicada		R^2
	R^2	Máxima explicável $(SQ_T - SQ_e)/SQ_T$	
Aço inoxidável	0,725	0,935	0,775
PVC _{RG}	0,811	0,982	0,825
PVC _{RF}	0,793	0,98	0,828

A variação explicada pela regressão é a razão entre a soma quadrática devida à regressão e a soma quadrática total. Esse valor, por exemplo, $R^2 = 0,725$ no caso do aço inoxidável, porém, não deve ser comparado com 1,0, por causa da contribuição devida ao erro puro (BARROS NETO et al, 2003). Neste, o valor máximo explicável, segunda coluna da Tabela 7, é calculado pela diferença entre a soma quadrática total e a soma quadrática do erro puro dividido pela soma quadrática total.

Dessa forma, o coeficiente de determinação R^2 obtido pela análise de regressão deve ser comparado com a máxima variação explicável. No caso do aço inoxidável, por exemplo, compara-se $R^2 = 0,725$ com 0,935. Assim, o valor do coeficiente de determinação é $R^2 = 0,775$.

Ozer e Demirci (2006) desenvolveram um modelo empírico para prever a redução logarítmica da população de *E. coli* O157:H7 inoculada em salmão cru tratado com água oxidada eletrolizada. A análise de variância para a redução logarítmica mostrou que nenhum dos termos da equação teve efeito significativo ($p > 0,05$) na predição do modelo. A regressão linear resultou num valor de $R^2 = 0,52$, indicando que o modelo não explicou suficientemente a variabilidade nos valores da redução logarítmica.

Graham et al (1996) usaram modelo quadrático para estudar o efeito da temperatura, pH e cloreto de sódio no tempo lag de *Clostridium botulinum* não proteolítico obtendo $R^2 = 0,856$. Modelos de fácil medição são usados em modelagem microbiana, porém, melhores

ajustes poderão ser encontrados levando-se em conta outros fatores biológicos inerentes ao microrganismo (TROLLER, 1993; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BOWER et al, 1996).

Não existe um critério pelo qual possa se dizer que o modelo tem um funcionamento aceitável, ou seja, possa ser validado. Porém, desde a introdução dos fatores *bias* e exatidão, muitos autores têm sugerido valores críticos a estes índices, o que permite a interpretação para a validação do modelo (MELLEFONT et al, 2003). Neste estudo, a eficácia do modelo que descreve a adesão de *E. coli* O157:H7 nas superfícies de aço inoxidável, PVC_{RG} e PVC_{RF} foi avaliado por três critérios: teste de F, fator *bias* e fator exatidão (BARANYI et al, 1999; GARCÍA-GIMENO et al, 2005; ROSS, 1996; ZURERA-COSANO et al, 2006).

Os fatores *bias* calculados para o aço inoxidável, para o PVC_{RG} e para o PVC_{RF} foram 1,12, 1,13 e 1,13 respectivamente, enquanto que os fatores exatidão foram 1,48, 1,34 e 1,35 respectivamente.

A significância da magnitude do fator *bias* depende da quantidade de crescimento que ocorre e se o modelo que está sendo avaliado é para deterioração ou crescimento de organismos patogênicos. Assim, o fator *bias* deve ser interpretado de uma maneira consistente com a situação pela qual o modelo preditivo está sendo utilizado. Dalgaard (2000) sugeriu que o fator *bias* na faixa de 0,75 – 1,25 indica uma avaliação eficaz do modelo de deterioração para frutos do mar. Ross (1996) propôs a seguinte interpretação do fator *bias*, quando usado para avaliação da eficácia do modelo envolvendo patógenos:

- 0,90 – 1,05 pode ser considerado bom;
- 0,70 – 0,90 ou 1,06 – 1,15 pode ser considerado aceitável;
- < 0,70 ou > 1,15 deve ser considerado inaceitável.

De acordo com esses padrões, os resultados dos fatores *bias* encontrados neste estudo estão dentro da faixa em que o modelo é considerado aceitável, indicando que não existem predições tendenciosas pelo modelo encontrado.

Qingli et al (2007) utilizaram modelo de superfície de resposta na predição de parâmetros de crescimento de esporos de *Clostridium sporogenes* sob diferentes condições ambientais e encontraram um fator *bias* de 0,986 e 1,001 na avaliação matemática para velocidade de crescimento e tempo lag, respectivamente. Esses autores também concluíram que o modelo de superfície de resposta foi um método eficaz e preciso na predição desses

parâmetros de crescimento para esporos de *Clostridium sporogenes*, e poderia ser aplicado para garantir a segurança alimentar com relação ao controle de *Clostridium botulinum* proteolítico.

O erro na estimativa da taxa de crescimento sob condições laboratoriais controladas é estimado em torno de 10 % por variável independente (ROSS et al, 2000a). Esses autores propuseram que, como uma maneira prática de proceder, espera-se que cada variável ambiental do modelo adicione uma quantidade similar de erro relativo. Além disso, um fator exatidão aceitável pode ser determinado considerando-se o efeito do número de parâmetros ambientais no modelo cinético.

O erro experimental normal e a variabilidade biológica contribuem para a variação nos resultados derivados de experimentos conduzidos pelo pesquisador, garantindo a estimativa, e são refletidos no fator exatidão.

Considerando que o fator *bias* não provê uma indicação da precisão da estimativa, o fator exatidão também foi calculado. A estimativa média tende a ser menos precisa com o aumento do fator exatidão, enquanto que um valor de 1 indica que há uma perfeita consistência entre todos os valores preditos e observados (LEBERT et al, 2000). Neste estudo, os valores exatidão encontrados para o aço inoxidável, para o PVC_{RG} e para o PVC_{RF} foram 1,48, 1,34 e 1,35, respectivamente.

Ross et al (2000b) reportaram que um fator exatidão aceitável deve ser determinado considerando o efeito do número de parâmetros ambientais em um modelo cinético. Por exemplo, a melhor performance que deveria ser esperada de um modelo cinético abrangendo a temperatura, pH e NaCl sob a velocidade de crescimento, é aproximadamente 30 %, ou um fator exatidão de 1,3.

Buchanan e Bagi (1997) encontraram um fator exatidão de 1,55 para *E. coli* O157:H7 em meio BHI, enquanto que Neumeyer et al (1997) encontraram um fator exatidão de 1,23 em modelo de crescimento para *Pseudomonas putida* 1442 em meio de laboratório e 1,10 em alimentos líquidos homogêneos (leite e produtos lácteos).

Tamplin et al (2005) estudaram um modelo de crescimento aeróbico para *E. coli* O157:H7 em carne moída, utilizando caldo BHI com temperaturas variando de 10 °C a 42 °C e encontraram os seguintes fatores *bias* e exatidão: 1,05, 2,70, 1,00 e 1,29, 2,87, 1,03

para a velocidade de crescimento específica, duração da fase lag e densidade máxima da população, respectivamente.

Delignette-Muller et al (1995) estudando 755 casos de predição da literatura, onde 468 usaram modelo polinomial e 287 usaram modelos de raiz quadrada, mostraram que os erros médios foram altos para modelos polinomiais quando usados para modelar o tempo de geração e tempo de adaptação, resultando em média em torno de 25 %, e leve tendência para o lado não seguro.

Estes desvios podem ser visualizados na Figura 4, que compara os valores experimentais com os valores calculados. Os pontos acima ou abaixo da reta demonstram as variações em relação aos valores preditos e aos valores encontrados.

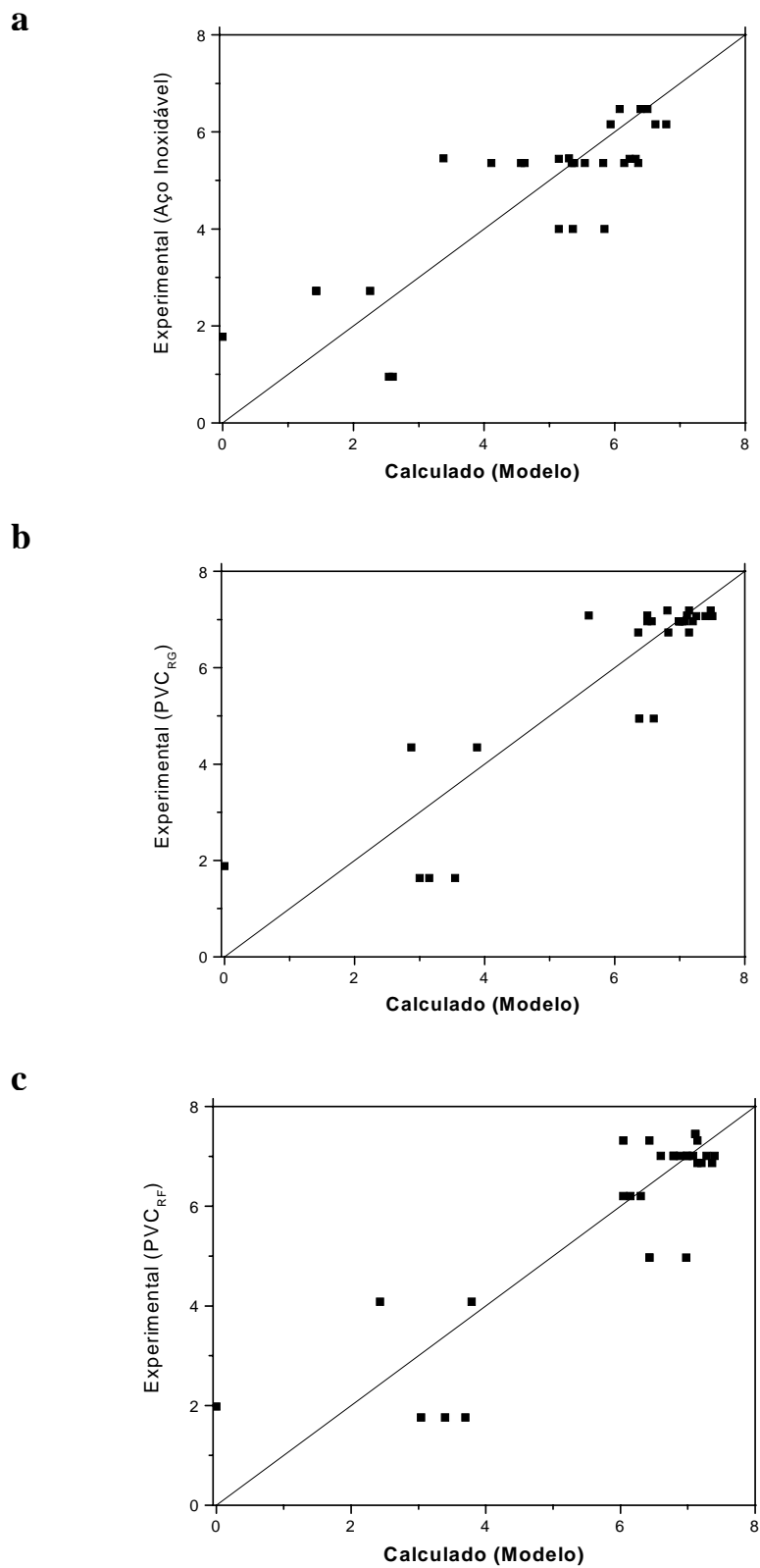


Figura 4: Gráfico de comparação entre resultados observados e resultados calculados. a) Aço inoxidável; b) PVC_{RG} e c) PVC_{RF}.

Dentre os modelos secundários, o modelo de superfície de resposta é muito usado em microbiologia preditiva para descrever o efeito da dependência de fatores ambientais sobre parâmetros de crescimento do microrganismo (GARCÍA-GIMENO et al, 2005; KALATHENOS et al, 1995; RAZAVILAR e GENIGEORGIS, 1998).

As interações das variáveis independentes sobre a adesão de *E. coli* O157:H7 são mostradas nos gráficos de superfície de resposta e gráficos de contorno (Figuras 5 a 7). Esses gráficos foram calculados com o modelo ajustado (Equações 6, 7 e 8), cujos coeficientes estão na Tabela 6 para cada uma das superfícies avaliadas.

Através da superfície de resposta gerada pelo modelo (Figuras 5 a 7), pode-se obter as condições de tempo e temperatura que resultaram em maior adesão. As curvas de contorno permitiram a verificação de várias combinações de tempo e temperatura que implicam em uma mesma adesão. Por exemplo, para o aço inoxidável (Figura 5b) uma combinação de 17 horas com 37,5 °C, 30 horas com 22 °C ou 40 horas com 14 °C resultam em uma adesão de 5,0 log UFC.cm⁻².

Modelos preditivos podem fornecer grande suporte de decisão nas diferentes áreas relevantes da indústria de alimentos. Na prática, a relação que modela a interface de crescimento / não crescimento fornece descrições exatas de circunstâncias que podem ser aplicadas no controle de um processo ou para especificar uma formulação que assegure ausência de patogênicos ou deteriorantes que possam vir a se desenvolver. Como reportado por Mcmeekin et al (2000) esta técnica oferece um mecanismo de como estabelecer limites das variáveis em estudo que o processador deve levar em consideração. Conhecendo esta região é possível também estudar o mecanismo fisiológico para qualquer lado da interface, pois é de se esperar que muitos dos acontecimentos que ocorram na interface possam ter respostas invertidas.

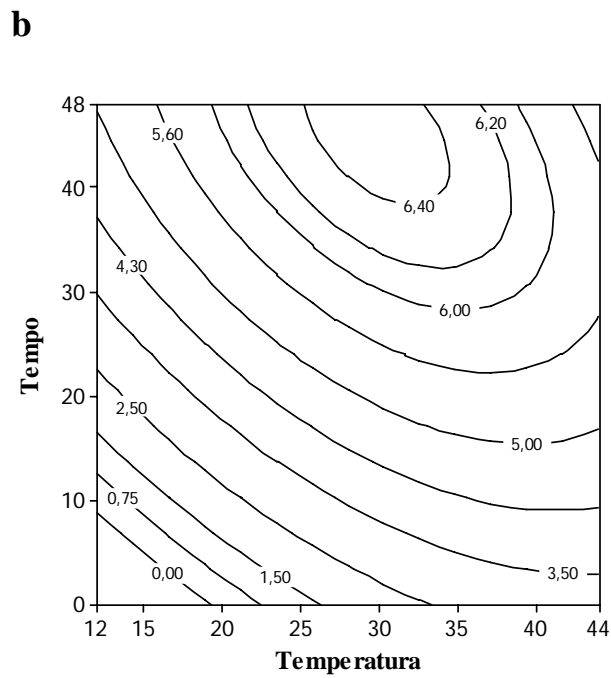
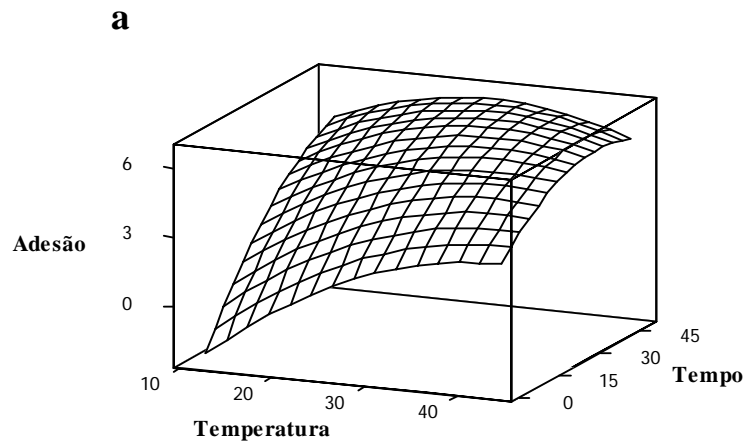


Figura 5: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em aço inoxidável em função do tempo e da temperatura.

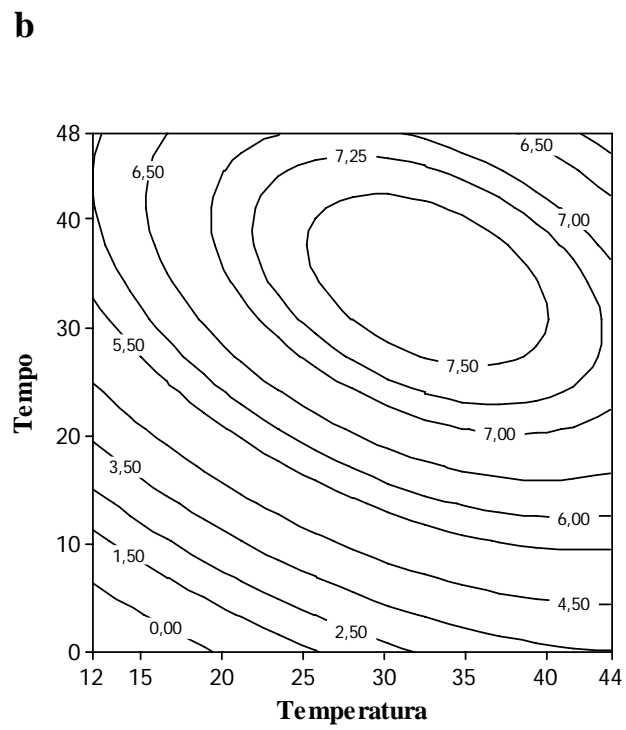
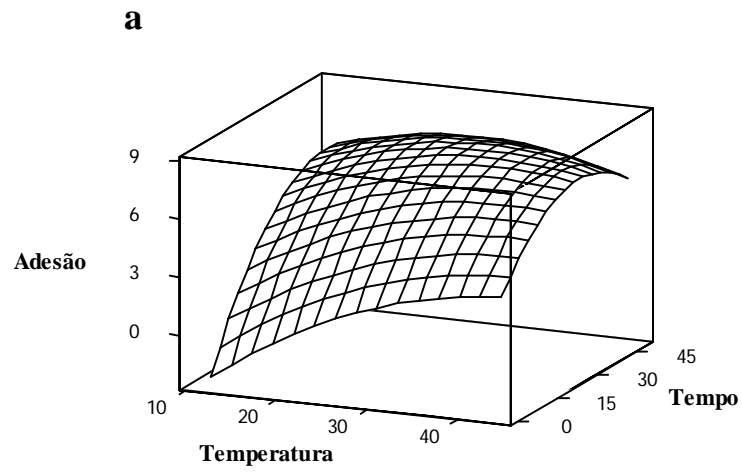


Figura 6: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em PVC_{RG} em função do tempo e da temperatura.

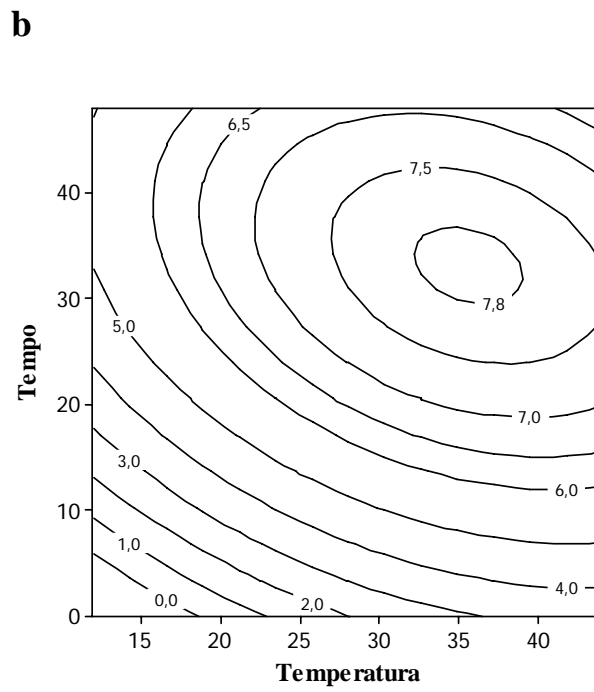
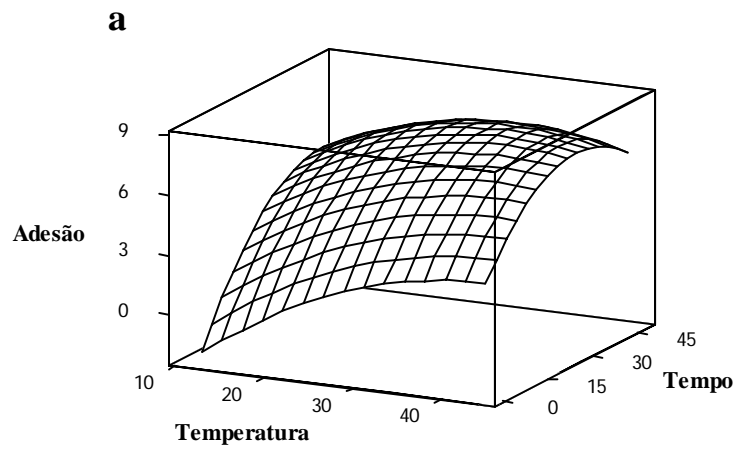


Figura 7: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em PVC_{RG} em função do tempo e da temperatura.

2.5.4 Verificação experimental dos modelos encontrados

Para verificação dos modelos encontrados foram conduzidos ensaios experimentais em condições que não haviam sido avaliadas na implementação dos modelos, como forma de testar a eficácia do modelo (Tabela 8).

Tabela 8: Ensaios de verificação experimental dos modelos preditivos nas três superfícies avaliadas.

Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Aço inoxidável		PVC _{RG}		PVC _{RF}	
		Experimental	Predito	Experimental	Predito	Experimental	Predito
35	22	5,32	5,66	6,25	7,26	7,30	7,34
35	39	6,20	6,53	6,79	7,72	7,54	7,87

Observou-se que para todas as predições os resultados foram maiores que os valores experimentais encontrados, ou seja, predições tendem para o lado seguro onde as taxas de adesão preditas foram superiores às reais. Este é um fator importante quando o modelo é ajustado para indústrias de alimentos, pois predições menores que as reais podem colocar em risco a segurança do consumidor, enquanto predições maiores que as reais resultam em maior controle.

2.6 CONCLUSÕES

- 1- Foi observado um aumento da adesão de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) em função do tempo de contato para as superfícies avaliadas;
- 2- Uma menor adesão ocorreu para o aço inoxidável e uma maior adesão no PVC_{RF}, após 10 horas de contato;
- 3- Observou-se pelo teste de Scott-Knott que não houve diferença significativa na adesão do microrganismo ($p > 0,05$) para o aço inoxidável e PVC_{RF} nos tempos de 2 horas e 4 horas de contato;
- 4- Nos tempos de contato igual e superior a 6 horas houve diferença significativa na intensidade de adesão em todas as superfícies avaliadas;
- 5- Avaliando-se cada superfície ao longo dos diferentes tempos de contato, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na adesão do microrganismo;
- 6- Na observação microscópica verificou-se que a superfície de aço inoxidável apresentou características microtopográficas muito diferente comparadas às demais superfícies, o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão constatados nesse experimento;
- 7- Pela análise de regressão verificou-se que para a adesão em aço inoxidável e em PVC_{RF} as variáveis tempo e temperatura foram significativas ($p < 0,05$), tanto no modelo linear quanto no modelo quadrático, e que não houve interação entre os fatores. Para a adesão em PVC_{RG} ambas as variáveis foram significativas ($p < 0,05$) e houve interação entre os fatores;
- 8- A análise de variância (ANOVA) mostrou que a regressão foi significativa para a adesão nas três superfícies avaliadas;

9- O coeficiente de determinação R^2 obtido pela análise de regressão foi de 0,775 para o aço inoxidável, 0,825 para o PVC_{RG} e 0,828 para o PVC_{RF}.

10- Os fatores *bias* calculados para o aço inoxidável, para o PVC_{RG} e para o PVC_{RF} foram 1,12, 1,13 e 1,13 respectivamente, enquanto que os fatores exatidão foram 1,48, 1,34 e 1,35 respectivamente.

11- Foi verificado por meio da implementação do desenho composto central rotacional que os modelos obtidos para as três superfícies foram validados, uma vez que para todas as predições os resultados foram maiores que os valores experimentais encontrados, ou seja, predições tenderam para o lado seguro onde as taxas de adesão preditas foram superiores às reais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, G.; DEBRAY, E.; CANDAU, Y. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.10, p.3073-3080, 1990.

ALLISON, D.G.; MCBAIN, A.J.; GILBERT, P. Biofilms: problems of control. In: GILBERT, P.; LAPPIN-SCOTT, M.; WILSON, M. (Eds). **Community Structure and Cooperation in Biofilms**. Cambridge: University Press, 2000. p.309-328.

ANDRADE, N.J.; AJAO, D.B.; ZOTTOLA, E.A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, p.1454-1458, 1998a.

ANDRADE, N.J., BRIDGEMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.7, p.833-838, 1998b.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; LIMA, J.C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N.J. (Ed). **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008, p.15-40.

BARANYI, J.; PIN, C.; ROSS, T. Validating and comparing predictive models. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.48, p.159-166, 1999.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predict bacterial growth in food. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p.277-294, 1994.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 2ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003. 401p.

BEECH, I.B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms – current understanding and state of the art methods of study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v.53, p.177-183, 2004.

BEECH, I.B.; GAYLARDE, C.C. Adhesion of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* to mild steel surfaces. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.67, p.201-207, 1989.

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

BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, p.1000-1005, 2001.

BERNARDEAU, M., VERNOUX, J.P., GUEGUEN, M. Usefulness of epifluorescence for quantitative analysis of lactobacilli in probiotic feed. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91, p.1103-1109, 2001.

BLACKBURN, W.C. Modeling shelf-life. In: KILCAST, D., SUBRAMANIAM, P. (Eds). **The stability and shelf-life of Food**. Cambridge: CRC Press LLC, 2000. Cap.3.

BOLETTI, F.T. Manufacture of vinegar. In: MARSHALL, C.E. (Ed). **Microbiology: a textbook on microorganisms general and applied**. London: Churchill, 1921. p.636-648.

BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**, Orlando, v.23, p.179-230, 1999.

BOULANGE-PETERMANN, L. Process of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. **Biofouling**, Buckingham, v.5, p.21-36, 1996.

BOULANGE-PETERMANN, L.; RAULT, J.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. **Biofouling**, Buckingham, v.11, p.201-216, 1998.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. **Regulamentos Técnicos sobre Inspeção Sanitária, Boas Práticas de Produção/Prestação de Serviços e Padrão de Identidade e Qualidade na Área de Alimentos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 13 maio 2005.

BROUGHALL, J.M.; ANSLOW, P.; KILSBY, D.C. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.55, n.1, p.101-110, 1983.

BROUGHALL, J.M.; BROWN, C. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development and application of three-dimensional models to predict bacterial growth. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.1, n.1, p.13-22, 1984.

BUCHANAN, R.L.; BAGI, L.K. Effect of water activity and humectant identify on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.14, p.413-423, 1997.

BUCHANAN, R.L. Predictive food microbiology. **Trends in Food Science & Technology**, Orlando, v.4, p.6-11, 1993.

CARELI, R.T. Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos. 2005. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

CRIADO, M.T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.2, p.123-126, 1994.

CZECHOWSKI, M.H. Gasket and stainless steel surface sanitation: environmental parameters affecting bacterial attachment. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, p.38-39, 1990.

DALGAARD, P. Fresh and lightly preserved seafoods. In: MAN, C.M.D; JONES, A.A. (Eds). **Shelf life evaluation of food**. 2 ed. Maryland: Aspen Publishing, 2000. p.110-139.

DANESE, P.N.; PRATT, L.A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* k-12 biofilm architecture. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, p.3593-3596, 2000.

DELIGNETTE-MULLER, M.L.; ROSSO, L.; FLANDROIS, J.P. Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.27, n.2-3, p.139-146, 1995.

DENYER, S.P.; GORMAN, S.P.; SUSSMAN, M. **Microbial biofilmes: formation and control**. Londres: Blackwell Scientific Publications. 333p. 1993.

DEWANTI, R; WONG, C.M. Influence of culture conditions on biofilms formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, p.147-164, 1995.

DI MARTINO, P. et al. *Klebsiella pneumoniae* type 3 *pili* facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Research in Microbiology**, Paris, v.154, p.9-16, 2003.

DRUGGAN, P.; FORSYTHE, S.J.; SILLEY, P. Indirect impedance for microbial screening in the food and beverage industries. In: **New Techniques in Food and Beverage Microbiology**. Society for Applied Bacteriology, Technical series n° 31. Oxford: Blackwell Science, 1993. p.120-125.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002. 424p.

FRANK, J.F.; EHLERS, J.; WICKER, L. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. **Food Protection Trends**, Des Moines, v.23, p.654-663, 2003.

FRANK, J.F. Microbial attachment to food and food contact surfaces. **Advances in Food and Nutrition Research**, Lincoln, v.43, p.319-370, 2000.

GARCÍA-GIMENO, R.M. et al. Response surface model for estimation for *Escherichia coli* O157:H7 growth under different experimental conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.70, p.M30-M36, 2005.

GIBSON, A.M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 62, p.479-490, 1987.

GIFFEL, M.C.; ZWIETERING, M.H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.46, p.135-149, 1999.

GRAHAM, A.; MASON, D.R.; PECK, M.W. Predictive model of the effect of temperature, pH and sodium chloride on growth from spores of non proteolytic *Clostridium botulinum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.31, n.1, p.69-85, 1996.

GRAU, F.H.; VANDERLINDE, P.B. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: Equations describing the effects of temperature and pH. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56, n.2, p. 96-101, 1993.

HAEGHEBAERT, S. et al. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. **Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire**, Paris, v.50, p.249-254, 2002.

HAYES, P.R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Tradução Bernabé Sanz Pérez. Zaragoza : Acribia, 1993. p.187-196.

HERALD, P.J.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.51, n.6, p.445-448, 1988.

HEYDOM, A. et al. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling and stationary-phase α factor expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.2008-2017, 2002.

HJELM, M. et al. Comparison of adhesion of the food spoilage bacterium *Shewanella putrefaciens* to stainless steel and silver surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, p.903-911, 2002.

HOLAH, J.T.; TAYLOR, J.H.; DAWSON, D.J. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent stains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Society for Applied Microbiology Symposium Series**, Bedford, v.31, p.111S-120S, 2002.

HOLT, J. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9.ed., Baltimore: Williams Wilkins, p.93, 1994.

HOOD, S.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Amsterdam, v.6, p.8-18, 1995.

JULLIEN, C. et al. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, California, v.56, p.77-87, 2002.

KAMAU, D.N.; DOORES, S.; PRUITT, K.M. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.9 p.2711-2716, 1990.

KALATHENOS, P. et al. A response surface study on the role of some environmental factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.25, p.63-74, 1995.

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

JEYAMKONDAN, S.; JAYAS, D.S.; HOLLEY, R.A. Microbial growth modeling with artificial neural networks, **International journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.64, n.3, p.343-354, 2001.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.64, p.367-372, 2001.

LEBERT, I.; ROBLES-OLVERA, V.; LEBERT, A. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.61, p.27-39, 2000.

LE CLERCQ-PERLAT, M.N.; LALANDE, M. Clean ability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. **Journal of Food Engineering**, California, v.23, p.501-517, 1994.

LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, London, v.11, p.179-184, 2003.

LEREBOUR, G.; CUPFERMAN, S.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin[®] reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v.97, p.7-16, 2004.

MAO, Y.; DOYLE, M.P.; CHEN, J. Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, p.3811-3815, 2001.

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

MCCLURE, P.J.; COLE, M.B.; DAVIES, K.W. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p.359-375, 1994.

MCMEEKIN, T.A. et al. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. **Journal of applied Bacteriology**, Oxford, v.62, n.6 p.543-550, 1987.

MCMEEKIN, T.A. et al. Quantifying the hurdle concept by modeling the bacterial growth/no growth interface. **International Journal Food Microbiology**, v.55, p.93-98. 2000.

MCMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N.; ROSS, T. **Predictive Microbiology: Theory and Application**. England: Research Studies Press. 1993. 340p.

MELLEFONT, L.A.; MCMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.82, p.45-58, 2003.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of applied Microbiology**, Northern Ireland, v.97, p.262-270, 2004.

NEUMEYER, K. et al. Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of Psychrotrophic Pseudomonads. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.38, p.55-63, 1997.

OULAHAL-LAGSIR, N.; MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M. 'Escherichia coli – milk' biofilm removal from stainless steel surfaces: Synergism between ultrasonic waves and enzymes. **Biofouling**, Buckingham, v.19, p.159-168, 2003.

OZER, N.P.; DEMIRCI, A. Electrolyzed oxidizing water treatment for decontamination of raw salmon inoculated with Escherichia coli O157:H7 and *Listeria monocytogenes* Scott A and response surface modeling. **Journal of Food Engineering**, California, v.72, p.234-241, 2006.

PARIZZI, S.Q.F. Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas. 1999. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

PETERS, A.C.; ELVERS, K.T.; GRIFFITH, C.J. Biofilm in the industry: Assessing hazards and risks to health. In: WIMPENNY, J.; GILBERT, P.; WALKER, J. (Eds). **Biofilms – The good, the bad and the ugly**. Cardiff: BioLine, 1999.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.17, p.361-365, 2000.

QINGLI, D. et al. Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, p.624-632, 2007.

RATKOWSKY, D.A. Principles of nonlinear regression modelling. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, New York, v.12, n.3-5 p.195-199, 1993.

RAZAVILAR, V.; GENIGEORGIS, C. Prediction of *Listeria* spp. Growth as affected by various levels of chemicals, pH, teperature and storage time in a model broth. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.40, p.149-157, 1998.

RODOLFO JR., A., NUNES, L.R., ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC**. São Paulo: Proeditores/Braskem, 2002.400 p.

RONNER, A.B.; WONG, A.C.L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.61, p.81-85, 2000.

ROSS, T.; BARANYI, J.; MCMEEKIN, T.A. Predictive Microbiology and food safety. In: ROBINSON, R.; BATT, C.A.; PATEL, P. (Eds). **Encyclopaedia of Food Microbiology**. London: Academic Press, 2000a. p.1699-1710.

ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.62, p.231-245, 2000b.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, p.501-508, 1996.

RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: Effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.1, p.247-254, 2005.

RYU, J.H.; KIM, H.; BEUCHAT, L.R. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, p.2123-182131, 2004a.

RYU, J.H. et al. Attachment and biofilm formation by on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.39, p.359-362, 2004b.

SAKURAI, A.; IMAI, H.; TAKENAKA, Y.; SAKAKIBARA, M. Simulation of citric acid production by rotating disk contactor. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v.56, p.689-696, 1997.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W.; HADDAD, A.; SESSO, A. (Eds). **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, v.1, p.71-79, 1989.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**, Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995. 159p.

SKINNER, E.G.; LERKIN, J.W. Mathematical modeling of bacterial growth: a review. **Journal of Food Safety**, New Brunswick, v.14, n.3, p.175-217, 1994.

STONE, L.S.; ZOTTOLA, E.A. A relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, p.951-956, 1985.

STOPFORTH, J.D.; SAMELIS, J.; SOFOS, J.N. Influence of extended acid stressing in fresh beef decontamination runoff fluids on sanitizer resistance of acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, p.2258-2266, 2003.

TAMPLIN, M.L. et al. Models of the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in raw sterile ground beef stored at 5 to 46 °C. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.100, p.335-344, 2005.

TAYLOR, J.H.; HOLAH, J.T. A comparative evaluation with respect to the bacterial cleanability of a range of wall and floor surface materials used in the food industry. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, p.262-266, 1996.

TORTORA, G.J.; BERDELL, R.F.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2000. p.96-98.

TROLLER, J.A. Sanitation in food processing. 2ª ed., New York: Academic Press, 1993. 478p.

VALCARCE, M.B.; BUSALMEN, S.R.; SÁNCHEZ, S.R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v.50, p.61-66, 2002.

VERGNAUD, J.M. Problems encountered for food safety with polymer packages: chemical Exchange, recycling. **Advances in Colloid and Interface Science**, Washington, v.78, n.3, p.267-297, 1998.

VIANA, E.S. Moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite. 2006. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. Predictive modeling In: DOYLE, M.P. BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Eds). **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington DC: ASM Press, 1997. p.728-739.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilm after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing system. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.7, p. 727-733, 1996.

WONG, H.; CHUNG, Y.; YU, J. Attachment and inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, p.341-350, 2002.

XAVIER, J.B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, 2005. Disponível em: <<http://www.dequim.ist.utl.pt/bbio/76/pdf/biofilmes.pdf>> Acesso em: 01 jul. 2005.

ZAQUEUS, O.M.; IIVANAINEN, E.K.; NISSINEN, T.K. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **Water Research**, Denmark, v. 34, p.63-70, 2000.

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

ZOTTOLA, E.A. Special techniques for studying microbial biofilms in food system. In: Tortorello, M.L., Gendel, S.M. **Food microbial analysis – new technologies**. IFT basic symposium series. Marcell Dekker, INC. Cap.16, p.315-346, 1997.

ZURERA-COSANO, G. et al. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. **Food Control**, Amsterdam, v.17, p.429-438, 2006.

CAPÍTULO 3

Atividade antimicrobiana de sanitizantes comerciais contra *Escherichia coli* O157:H7

3.1 INTRODUÇÃO

A higienização na indústria de alimentos se insere no contexto das Boas Práticas de Fabricação e dos programas de qualidade como o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Sob esta ótica, seu objetivo final é a obtenção de alimentos seguros, particularmente sob os aspectos associados às contaminações com agentes químicos, físicos e microbiológicos, além de contribuir para a manutenção das características sensoriais e nutritivas desses alimentos.

A sanitização de equipamentos utilizados no processamento de alimentos é importante para o controle da contaminação cruzada durante a produção. Limpeza e desinfecção são procedimentos que devem ser realizados regularmente, visto que eliminam grande parte dos microrganismos contaminantes. O tratamento torna-se mais difícil em função da maior resistência adquirida pelas células microbianas aderidas aos agentes antimicrobianos usados. E também pelo fato de que as informações contidas na maioria dos produtos disponíveis no mercado são obtidas a partir de testes contra células planctônicas (suspensas). As superfícies de processamento de alimentos são locais potenciais para a adesão bacteriana, que pode ocorrer até mesmo quando programas de higiene e sanitização são corretamente aplicados. Deste modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície.

A AOAC dispõe de dois métodos para determinação da atividade bactericida de sanitizantes. São os métodos de diluição de uso e de suspensão, e a principal diferença entre eles é a forma como os microrganismos são expostos à ação do sanitizante. No método de diluição de uso as células são fixadas e secas em um suporte sólido (carreador) e no método de suspensão são suspensas na própria solução sanitizante. A principal vantagem desses métodos é que todo o procedimento é criteriosamente padronizado, o que permite comparar resultados obtidos em qualquer laboratório do Brasil ou do exterior. O método de suspensão é mais simples, menos trabalhoso e mais barato, e permite avaliar basicamente o sanitizante em função do número de reduções decimais (RD) na população da bactéria. Consideram-se eficientes os sanitizantes que inativam 99,999 % (5RD) em 30 segundos de contato. Por esta razão, o método de suspensão foi o selecionado para a realização desse trabalho, cujo objetivo foi avaliar a resistência de *E. coli* O157:H7 aos sanitizantes mais amplamente usados na desinfecção de equipamentos e utensílios de indústrias de processamento de alimentos, restaurantes e cozinhas industriais.

3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.2.1 Sanitizantes usados na indústria de alimentos

A sanitização é definida como o tratamento de superfícies / equipamentos usando-se métodos físicos ou químicos, tais que a quantidade de microrganismos presentes é reduzida a números aceitáveis. Antes da sanitização, é necessária uma limpeza das superfícies para remover compostos orgânicos aderidos à mesma. Sem uma limpeza apropriada, a sanitização é inútil, pois o produto remanescente inativará o agente sanitizante e os microrganismos presentes sobreviverão ao tratamento. Esta etapa do procedimento de higienização tem como objetivo a eliminação dos microrganismos patogênicos e a redução dos deterioradores em níveis que atendam as especificações previamente propostas (ASSELT e GIFFEL, 2005).

Deve-se selecionar sanitizantes que i) sejam aprovados pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura; ii) apresentem amplo espectro de ação antimicrobiana e capazes de destruir rapidamente os microrganismos; e iii) sejam estáveis sob variadas condições de uso e que possuam baixa toxicidade e corrosividade (ANDRADE et al, 2008).

É importante saber que a ação dos sanitizantes pode ser alterada pelas características da superfície, pelo tempo e pela temperatura de contato, pela concentração de uso e pelos tipos de resíduos presentes nas superfícies, pelo pH, pelas propriedades físico-químicas da água e, ainda, por substâncias inativadoras. O tipo e a concentração de microrganismos contaminantes da superfície também influenciam na eficiência do sanitizante (RUSSELL, 1999).

A sanitização pode ser feita pelo uso de métodos físicos ou químicos. Em geral, os métodos físicos são preferidos quando estão disponíveis e não deixam resíduos. Entretanto, os métodos físicos não podem ser sempre aplicados em função de restrições, como, temperatura, segurança de pessoal e desenho do equipamento. Nesses casos, são utilizados os sanificantes químicos (ASSELT e GIFFEL, 2005).

Dentre os sanitizantes físicos mais usados na indústria de alimentos, incluem-se o calor, nas formas de ar quente, água quente, vapor e radiações, particularmente a radiação ultravioleta.

O calor quando possível deve ser o agente sanitizante escolhido, pois atinge toda a superfície, incluindo pequenos orifícios e ranhuras e não é seletivo contra os microrganismos (ANDRADE et al, 2008).

A radiação ultravioleta é usada no controle microbiológico em situações específicas de áreas de processamento, de laboratórios, câmaras de repicagens de microrganismos, superfícies de processamento de alimentos, como polietileno usado como embalagem de leite. Também pode ser usada no controle microbiológico de alimentos (RAJALA et al, 2003).

Existe uma grande variedade de sanitizantes químicos disponíveis, como, compostos clorados, compostos iodados, compostos de amônia quaternária, ácido peracético e peróxido de hidrogênio. Outros compostos podem ser usados em formulações de sanitizantes, principalmente aldeídos (por exemplo, glutaraldeído), fenóis (por exemplo, triclosan), biguaninas (por exemplo, clorexidina) e álcoois. O extrato de semente “grapefruit” também é usado como agente antimicrobiano. Todos esses agentes são quimicamente distintos, entretanto, alguns apresentam mecanismos similares de ação (ASSELT e GIFFEL, 2005).

Os compostos clorados podem ser classificados em inorgânicos e orgânicos. Dentre os primeiros, incluem-se o cloro gás (Cl_2), o hipoclorito de sódio (NaClO), o hipoclorito de cálcio, (CaClO_2) e o dióxido de cloro (ClO_2).

Para o procedimento de higienização na indústria de alimentos, o hipoclorito de sódio, ainda, é o mais utilizado, e é comercializado na forma líquida, em concentrações entre 2 % e 10 % de cloro residual total, expresso em Cl_2 . O hipoclorito de sódio apresenta uma série de vantagens comparativas em relação aos outros sanitizantes químicos: i)

relativamente baratos; ii) ação rápida; iii) não afetados pela dureza da água; iv) efetivos contra uma grande variedade de microrganismos, inclusive esporos bacterianos e bacteriófagos; v) efetivos em baixas concentrações; vii) relativamente não tóxicos nas condições de uso; viii) soluções de fácil preparação e aplicação; ix) concentração facilmente determinada; x) usado em tratamento de água e xi) os equipamentos não necessitam ser enxaguados após a sanitização, se a concentração de uso for controlada adequadamente. Dentre as desvantagens do uso do hipoclorito de sódio encontram-se i) instabilidade ao armazenamento; ii) inativação pela matéria orgânica; iii) corrosão, se não usados corretamente; iv) irritação à pele; v) precipitação em água contendo ferro; vi) menor eficiência em pH mais elevado e vii) oxidação da borracha, que muitas vezes são componentes de equipamentos, por exemplo, gaxetas de pasteurizadores (ANDRADE et al, 2008).

Os compostos clorados orgânicos são conhecidos como cloraminas orgânicas. As mais utilizadas são a cloramina T, a dicloramina T, o diclorodimetil hidantoína, as formas sódicas do ácido dicloroisocianúrico e ácido tricloroisocianúrico. Esses compostos se apresentam na forma de pó em teores entre 24 % e 90 % de cloro residual total expresso em Cl_2 . Em comparação aos clorados inorgânicos liberam mais lentamente o ácido hipocloroso, permanecendo efetivos por períodos de tempo maiores e são menos reativos com a matéria orgânica, portanto formam menos trihalometanos e são mais estáveis ao armazenamento (RODGERS et al, 2004).

Na indústria de alimentos, os compostos clorados podem ser utilizados para a sanitização de superfícies de paredes, pisos, tetos, equipamentos e utensílios, para a redução do número de microrganismos em carcaças bovinas, suínas e de aves, para a redução do número de microrganismos em frutas e vegetais minimamente processadas, para o controle microbiológico de água de resfriamento de alimentos enlatados esterilizados (WEI et al, 1995).

Um tratamento com dióxido de cloro aquoso em semente de alfafa inoculado com *E. coli* por 10 minutos com uma concentração de 25 mg.L^{-1} resultou em, aproximadamente, uma redução decimal de microrganismos. Comparado com solução padrão de cloro, hipoclorito de sódio, uma concentração de 3 mg.L^{-1} de dióxido de cloro teve o mesmo

efeito de inativação sobre *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* quando 200 mg.L⁻¹ de cloro foi aplicado para a descontaminação de superfícies de frutas (YOUNG e SETLOW, 2003).

A ação antimicrobiana dos compostos clorados, à exceção do dióxido de cloro, está associada à liberação do ácido hipocloroso em solução aquosa. Essa forma não dissociada é cerca de 80 vezes mais bactericida do que a forma dissociada (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

Uma vez que o modo exato de ação do ácido hipocloroso não é conhecido, o principal efeito sanitizante do cloro é causado pela atividade oxidativa. Em particular, ácidos nucleicos e proteínas são destruídos e resultam em mudanças irreversíveis e rompimento da síntese protéica do DNA (ASSELT e GIFFEL, 2005).

O mecanismo ação dos sanitizantes sobre os esporos difere em função de sua fina camada proteínica. Por isso, maiores concentrações são necessárias do que para a inativação de células vegetativas. Young e Setlow (2003) concluíram que o hipoclorito afeta a germinação de esporos possivelmente por causa dos prejuízos a sua membrana interna. Para uma suspensão de esporos, Young e Setlow (2003) constataram que uma concentração de 50 mg.L⁻¹, durante 10 minutos, a temperatura ambiente é suficiente para causar 4 reduções decimais em esporos de *Bacillus subtilis*. Uma concentração de 50 mg.L⁻¹ resultou em uma redução decimal para esporos de *B. cereus*, após 1,5 minuto de exposição. Esses resultados indicaram que a concentração inibitória mínima pode variar de acordo com a espécie.

Dentre os compostos iodados, os iodóforos são os mais frequentemente aplicados na indústria de alimentos. São formulações que combinam o iodo, um agente tensoativo e um agente veiculador ácido (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

O iodo é menos reativo que o cloro e menos afetado pela presença de matéria orgânica, mas apresenta desvantagens tais como: mancha a pele humana e as partes plásticas dos equipamentos, torna-se menos eficiente com o aumento do pH e também tem um preço relativamente alto quando comparado com o cloro (ASSELT e GIFFEL, 2005).

Os compostos de iodo são eficientes sobre variados grupos de microrganismos, com exceção de esporos e bacteriófagos. Esses sanitizantes são utilizados para diminuição da microbiota das mãos de manipuladores de alimentos, sanitização de equipamentos e

utensílios e diminuição da microbiota ambiental, quando aplicados na forma de nebulização (ANDRADE et al, 2008).

A ação bactericida dos compostos iodados deve-se principalmente ao I_2 liberado a partir dos complexos com agentes tensoativos. As formulações comerciais encontram-se na faixa de 0,5 % a 1,75 % de iodo residual livre, expresso em I_2 . As soluções diluídas de iodóforos são usadas numa concentração entre 10 - 25 mg.L⁻¹ (ANDRADE et al, 2008).

Os compostos de amônia quaternária são substâncias tensoativas catiônicas que apresentam propriedades antimicrobianas. São úteis para a sanitização de pisos, paredes e equipamentos e no controle microbiológico do ar de ambientes de processamento. Comparados com os compostos clorados, são mais caros, mas tem a vantagem de ter ação residual. Esses compostos permanecem ativos sobre as superfícies por, aproximadamente, um dia (por exemplo, indústria de peixes) e desfavorecem futuros crescimentos bacterianos. Porém, essa aderência à superfície também apresenta desvantagens. A remoção do sanitizante da superfície por lavagem com jato de água torna-se difícil, o que resulta em possíveis resíduos no produto (KRAEMER, 1998).

Em geral, os compostos de amônia quaternária são efetivos contra células vegetativas, mas têm maior eficácia contra bactérias Gram-positivas. Leveduras e mofo podem ser inativados, mas são necessárias altas concentrações. Não apresentam atividade esporocida. Esses compostos são mais efetivos em uma faixa de pH entre 6 e 10, o qual limita sua aplicabilidade em ambientes ácidos (SUNDHEIM et al, 1998).

O principal modo de ação é pela interferência nas propriedades de permeabilidade da membrana celular, o que leva ao extravasamento de metabólitos e, também, pela interferência no metabolismo de proteínas, causando a desnaturação protéica e inibição de enzimas (AASE et al, 2000).

As soluções de peróxido de hidrogênio apresentam uma forte ação oxidante associada à liberação de oxigênio que possui atividade sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (BRÍÑEZ et al, 2006).

Na indústria de alimentos é usado como sanitizante nas concentrações entre 0,3 % e 6 %, pH 4,0, e a temperatura ambiente até 80 °C durante 5 minutos a 20 minutos de contato. As soluções desse agente sanitizante apresentam baixa toxicidade e não requerem enxaguagem (ANDRADE et al, 2008).

O uso principal do peróxido de hidrogênio na indústria de alimentos é na esterilização de embalagens de produtos envasados assepticamente. Nessa última aplicação, as soluções contêm cerca de 30 % do princípio ativo, apresentando atividade sobre esporos bacterianos (ALT et al, 1999).

O ácido peracético comercial é um sanitizante constituído por uma mistura de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante. É um agente antimicrobiano mais eficiente do que o peróxido de hidrogênio sendo ativo contra um grande espectro de microrganismos. É esporicida em baixas temperaturas e permanece ativo na presença de matéria orgânica (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

Dentre as vantagens do ácido peracético, verificam-se que são excelentes sanitizantes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus e esporos bacterianos. É corrosivo ao aço inoxidável, mas não há necessidade de ser enxaguados das superfícies, quando as concentrações das soluções de uso são corretamente controladas. Não são afetados pela dureza da água, mas possuem baixa estabilidade ao armazenamento, são irritantes à pele e às mucosas (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

As soluções de ácido peracético têm sido crescentemente empregadas nas etapas de sanitização nas indústrias de alimentos, principalmente laticínios e cervejaria (Rossoni e GAYLARDE, 2000).

O modo de ação do peróxido de hidrogênio e do ácido peracético é baseado na oxidação do radical livre (por exemplo, radicais hidroxilas) de componentes essenciais da célula, tais como, lipídios, proteínas e DNA. O ácido peracético não somente ataca as proteínas da parede celular, mas também migram dentro da célula, e da mesma forma, rompem componentes internos da célula (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

O extrato de semente de “grape fruit” é um sanitizante de origem orgânica, sendo um complexo estabilizado fisicamente e integrado por pequenas concentrações de substâncias químicas naturais. Dentre essas substâncias, encontram-se ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido palmítico, glicerídeos, tocoferóis e aminoácidos. Produtos comerciais contendo cerca de 10 % do princípio ativo são disponibilizados às indústrias de alimentos. Soluções diluídas contendo cerca de 400 mg.L⁻¹ desse extrato são aplicadas em ambientes de processamento, instalações, equipamentos e utensílios (ANDRADE et al, 2008).

3.2.2 Fatores que influenciam a resistência microbiana

Os mecanismos de ação dos sanitizantes estão se tornando mais claros, o que permite que seus efeitos sobre os microrganismos sejam preditos. A sobrevivência dos microrganismos a sanitização depende na prática de mais que um fator. No mínimo quinze fatores parecem influenciar a possível resistência da cepa microbiana (BAQUERO et al, 1998).

Um modelo para prever o efeito de um único sanitizante em um ambiente não específico pode ser difícil de ser realizado. Portanto, a realização de testes sob condições práticas são necessárias para determinar o efeito de um certo sanitizante. Como nem todo detalhe é conhecido, é possível determinar se o sanitizante será efetivo com base nas seguintes informações: tipo de bactéria, estado metabólico, recuperação de células injuriadas / biodiversidade de microrganismos, influência da matéria orgânica remanescente / biofilme e condições de processamento como temperatura e pH (ASSELT e GIFFEL, 2005).

O estado metabólico do microrganismo é importante na determinação do possível efeito do sanitizante. Com referência as células vegetativas, microrganismos Gram-positivos parecem ser mais resistentes do que os Gram-negativos em função da composição da parede celular. A parede celular dos Gram-positivos contém menos lipídios comparada com a dos Gram-negativos (RUSSELL, 1999). Esporos bacterianos são mais resistentes a agentes químicos e físicos, principalmente em função da camada e ao córtex do esporo (SETLOW et al, 2002).

Para os agentes químicos, as concentrações esporicidas são em muitos casos dez vezes, ou mais, maiores que as concentrações bacterianas. No caso de fenóis, ácidos orgânicos, biguaninas, organomercúrios e álcoois usados em altas concentrações, os agentes não têm efeito esporicida (RUSSELL, 1990).

Um outro aspecto a ser observado é a diferença no prejuízo causado a célula após o tratamento com os sanitizantes. Isso significa que uma certa quantidade de células pode se recuperar. Entretanto, esta recuperação não indica necessariamente um mecanismo de resistência, mas ocorre associada à variação estatística do sistema de proteção dos microrganismos (HEINZEL, 1998).

O pH é um importante fator que pode modificar a aplicação prática dos sanitizantes usados (RUSSELL, 1991). Por exemplo, para o cloro, o pH deve estar em uma faixa entre 5 e 8 para ser efetivo como ácido hipocloroso. Abaixo de pH 5, o gás cloro é produzido e causa uma toxicidade aguda, e, acima de pH 8 os íons ClO^- são produzidos, não sendo ativo como sanitizante. Portanto, o conhecimento do pH do ambiente faz com que seja possível prever se o sanitizante será ativo.

Além do pH, outros parâmetros de processamento, como, temperatura, concentração e tempo de aplicação são importantes fatores que afetam a resistência dos microrganismos. Por exemplo, quando a temperatura da solução de formaldeído é aumentada em 10 °C, sua eficácia é aumentada entre três e cinco vezes. Em relação à concentração, quando é muito baixa, o sanitizante somente tem ação bacteriostática ao invés de bactericida. Por outro lado, quando a concentração é muito alta, o sanitizante agirá rápido, mas a questão é saber se isso é realmente necessário. Quando não for o caso, aumentarão os custos e pode ser perigoso para o ambiente (pessoal, equipamentos) (RUSSELL, 1999).

Como regra geral, o processo de sanitização será efetivo somente quando o equipamento ou superfície for adequadamente limpo antes da sanitização. Isso pode ser explicado pelo fato de que a matéria orgânica remanescente inativará o sanitizante e os microrganismos não serão afetados. Uma segunda razão é que componentes orgânicos agem como uma camada protetora para os microrganismos (KRAEMER, 1998). Este caso também se aplica aos microrganismos que formam biofilmes onde, como resultado da limitação de nutrientes, uma taxa de crescimento reduzido torna microrganismos específicos menos suscetíveis ao sanitizante. O fato de microrganismos poderem formar biofilmes implica em uma mudança nas suas características de crescimento, podendo também resultar em resistência contra sanitizantes (BROWN e GILBERT, 1993).

3.2.3 Métodos de avaliação da eficiência do procedimento de higienização

Um dos principais fatores que influenciam a escolha do método para a avaliação de superfícies na indústria é o tipo de microrganismo contaminante, em razão das condições de sobrevivência e sua concentração esperada. Além disso, influenciam também a topografia e

as condições das superfícies, que envolve a presença de ranhuras e de resíduos de detergentes, de sanitizantes e de alimentos (EVANCHO et al, 2001).

Não há uma metodologia universal para a avaliação microbiológica na indústria. Entretanto, pela combinação de metodologias, é possível verificar as condições higiênicas durante o processamento dos alimentos. Como em qualquer análise, o sucesso e a eficiência do método dependem do conhecimento prévio sobre distribuição e adesão bacteriana, sobrevivência e recuperação de microrganismos estressados.

A indústria de alimentos deve propor limites de segurança que deverão ter um sistema de monitoramento, de medição e de registro com frequência definida para assegurar que o procedimento será efetivo e o que foi estabelecido será alcançado. Dentro dos limites estabelecidos, pode-se considerar que os perigos químicos, físicos e ou microbiológicos serão controlados. Dentre desses controles estão incluídos, por exemplo: i) as concentrações dos princípios ativos das soluções sanitizantes; ii) as concentrações dos detergentes; iii) as recomendações de qualidade microbiológica estabelecida com critério técnico para superfícies higienizadas, ambientes de processamento, manipuladores e de equipamentos (ANDRADE et al, 2008).

Os limites críticos devem ser monitorados por técnicas convencionais e / ou de desenvolvimento recente, desde que sejam recomendadas por entidades oficiais ou por entidades de reconhecida competência como a “Association Official of Analytical Chemists” (AOAC) e “American Public Health Association” (APHA). Normalmente, são os testes em uso que melhor avaliam o procedimento de higienização. Esses testes consistem em remover microrganismos das superfícies de mãos, equipamentos e utensílios. A remoção dos microrganismos pode ser feita por atrito, como no método do “swab”, por contato, como no método de placas de contato, ou ainda, por meio da lavagem da superfície com água destilada ou soluções apropriadas. Em seguida, os microrganismos são recuperados em meios de cultura e em condições de incubação apropriadas, usando-se neutralizantes adequados para o sanitizante sob avaliação (RICHARDSON, 1985).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Avaliação da resistência de *E. coli* O157:H7 a diferentes sanitizantes comerciais

Usou-se como estirpe de referência para condução dos testes, *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), obtida junto à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A resistência de *E. coli* O157:H7 foi avaliada pelo método de suspensão N° 960.09 da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) (Beloian, 1998) adotado oficialmente no Brasil pela PORTARIA 336 de 22 de julho de 1999 (BRASIL, 1999), frente aos seguintes sanitizantes: hipoclorito de sódio, dicloroisocianurato de sódio, iodóforo, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, extrato de semente “grapefruit” e composto de amônia quaternária (Tabela 1). As concentrações foram quantificadas em seu princípio ativo segundo metodologia proposta por Eaton et al, (1995). Os tratamentos consistiram na utilização dos diferentes sanitizantes na diluição recomendada pelo fabricante. O controle consistiu em submeter a amostra padrão às mesmas condições, porém na ausência do sanitizante. Todos os ensaios foram realizados a 25 °C, em três repetições.

O método de suspensão N° 960.09 consiste em transferir 1 mL de uma suspensão da bactéria para um tubo de ensaio contendo 9 mL da solução do sanitizante durante 30 segundos de contato. Em seguida, transfere-se 1 mL do sanitizante contendo a suspensão da bactéria para um outro tubo contendo 9 mL de uma solução neutralizante. Após esse procedimento, faz-se o plaqueamento em ágar Mac-Conkey realizando-se diluições apropriadas e incuba-se a 37 °C, por 24 horas. A eficácia do sanitizante foi expressa em números de reduções decimais (RD) de cinco ciclos logarítmicos das UFC entre a população inicial (I) e a população sobrevivente (S), calculada pela fórmula $RD = \log I -$

logS. Consideraram-se eficientes os sanitizantes que eliminaram 99,999 % (5 RD), em 30 segundos de contato (Beloian, 1998). O teste de Tukey foi realizado usando o “General Lineal Models Procedure” do sistema SAS com um nível de significância de 5 %.

Tabela 1: Identificação e composição dos sanitizantes utilizados no presente estudo, respectivos neutralizantes, recomendação de uso pelo fabricante e pHs.

Produto	Composição	Neutralizante	Concentração	pH
Hipoclorito de Sódio	Hipoclorito de sódio com 2,5 % de cloro ativo	Tiosulfato de Sódio	100 mg.L ⁻¹	9,2
		0,5 %	200 mg.L ⁻¹	9,8
Dicloroisocianurato de Sódio	Dicloroisocianurato de Sódio com 6,2 % de cloro ativo	Tiosulfato de Sódio	100 mg.L ⁻¹	6,3
		0,5 %	200 mg.L ⁻¹	6,3
Iodóforo	Iodóforo contendo 4,24 % de iodo ativo	Tiosulfato de Sódio	25 mg.L ⁻¹	2,9
Ácido Peracético	Ácido Peracético 13,63 %	Tiosulfato de Sódio	30 mg.L ⁻¹	3,8
		0,5 %		
Peróxido de Hidrogênio	Peróxido de Hidrogênio 20 %	Tiosulfato de Sódio	1 %	4,4
		0,5 %	2 %	4,1
Amônia Quaternária	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio	Tween 80	0,20 %	6,2
Extrato de semente “grapefruit”	Ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico	Tiosulfato de Sódio	1:1500	4,1
		0,5 %	1:2000	4,3

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Avaliação da resistência de *Escherichia coli* O157:H7 a diferentes sanitizantes usados em superfícies de processamento pela contagem padrão em placas

Foi constatada uma variação na eficiência com base em reduções decimais no efeito antimicrobiano exercido pelos diferentes sanitizantes avaliados (Tabela 2). Observou-se que os tratamentos cujos limites superior e inferior estão abaixo da média de 5 ciclos de redução não foram eficientes (Figura 1). Pelo teste da AOAC, adota-se 30 segundos de tempo de contato entre o microrganismo e o sanitizante a ser testado. Na prática o tempo de ação / contato entre o sanitizante e a superfície a ser tratada varia de 15 a 20 minutos segundo a técnica de sanitização empregada. Este maior tempo de contato se deve a que uma vez comprovada a eficiência do sanitizante em termos de reduções decimais do microrganismo alvo, torna-se necessário minimizar a ação dos demais fatores externos que possam dificultar o acesso do sanitizante sobre a célula microbiana.

Tabela 2: Resultado dos testes de resistência de *E. coli* O157:H7 aos sanitizantes empregando-se o método AOAC 960.09

Sanitizante	Concentração	Contagem inicial, final e número de reduções decimais*		
		<i>E. Coli</i> O157:H7 ATCC 43895 (log UFC.mL ⁻¹)		
		Inicial	Final	Reduções*
Hipoclorito de sódio	100 mg.L ⁻¹	8,8	3,4	5,4
	200 mg.L ⁻¹	8,9	< 3,0	> 5,9
Dicloroisocianurato de sódio	100 mg.L ⁻¹	8,8	8,5	0,3
	200 mg.L ⁻¹	8,4	3,0	5,4

Iodóforo	25 mg.L ⁻¹	8,5	3,9	4,6
Peróxido de hidrogênio	1 %	8,6	5,1	3,5
	2 %	8,6	< 3,0	> 5,6
Ácido Peracético	30 mg.L ⁻¹	8,8	3,1	5,7
Extrato semente "grape fruit"	1:1500	8,6	2,7	5,9
	1:2000	8,6	5,3	3,3
Amônia quaternária	0,20 %	8,8	< 3,0	> 5,8

* O número de reduções decimais é definido como [Log UFC da população inicial – Log UFC da população final].

De acordo com esse critério adotado pelo teste da AOAC, o hipoclorito de sódio foi eficaz nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹. Este resultado ratifica os dados obtidos por Silva et al (2003) que avaliaram a resistência de *E. coli* O157:H7 aos sanitizantes disponíveis no mercado para desinfecção de verduras, equipamentos e utensílios. Ainda neste estudo, os autores avaliaram a resistência de *E. coli* (ATCC 11229), estirpe padrão recomendada pela AOAC para testes de eficácia antimicrobiana de sanitizantes de uso na indústria de alimentos, demonstrando que, nos testes realizados, as duas estirpes apresentaram comportamentos equivalentes quanto à resistência a esses agentes de sanitização.

Chesca (2002) realizou um estudo comparativo da eficácia antimicrobiana de diversos sanitizantes contra as estirpes de *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 e *E. coli* comum ATCC 11229, artificialmente inoculadas em amostras de alface, e observaram que o tratamento com 200 mg.L⁻¹ de hipoclorito de sódio / 15 min promoveu uma média de 4,09 reduções decimais na população de *E. coli* comum e 2,70 reduções decimais na população de *E. coli* O157:H7.

Kich et al (2004) avaliaram a atividade antibacteriana de hipoclorito de sódio em duas concentrações frente a amostras de *Salmonella Typhimurium* na presença e ausência de matéria orgânica e detectaram que o produto a base de hipoclorito de sódio não perdeu sua atividade na presença de matéria orgânica quando testado na dose recomendada pelo fabricante (1 %). Entretanto, foi inativado na concentração de 0,1 %, comumente adotada na suinocultura. Os hipocloritos são amplamente usados na indústria de alimentos, entre

outras razões, pela sua boa efetividade contra uma grande variedade de microrganismos e por ser ativo mesmo em baixas concentrações (ANDRADE et al, 2008).

Neste estudo, o tratamento com dicloroisocianurato de sódio não foi eficaz na concentração de 100 mg.L⁻¹, mas promoveu 5,4 reduções decimais na concentração de 200 mg.L⁻¹ (Figura 1). Dados diferentes foram encontrados por Silva et al (2003), que observaram uma redução decimal > 6,0 para este sanitizante em ambas concentrações. Segundo Chesca (2002), o tratamento com 200 mg.L⁻¹ de dicloroisocianurato de sódio / 15 min promoveu uma média de 3,69 reduções decimais na população de *E. coli* comum e 2,57 reduções decimais na população de *E. coli* O157:H7. Não houve diferença significativa entre resultados obtidos contra *E. coli* O157:H7 e *E. coli* comum, comprovando que as duas estirpes apresentaram resistência semelhante aos tratamentos de sanitização com compostos de cloro. Os resultados distintos constatados por Chesca (2002) provavelmente se devem à diferença na forma de exposição das células ao sanitizante que foram fixadas em folhas de alface, enquanto neste caso, foram colocadas em suspensão. Outro fator importante a considerar é o fato de sanitizantes com o mesmo princípio ativo, porém de marcas comerciais distintas, apresentarem diferença na eficácia antimicrobiana (EIROA e PORTO, 1995). Portanto, a determinação do princípio ativo é necessária para padronizar a concentração das substâncias a serem testadas. Assim, é imprescindível o monitoramento periódico da qualidade dos produtos disponíveis no mercado, para garantir segurança dos tratamentos de sanitização aplicados.

Rossoni e Gaylarde (2000) compararam o hipoclorito de sódio e ácido peracético (APA) como agentes sanitizantes para superfícies de aço inoxidável usadas no processamento de alimentos. Esses autores concluíram que o hipoclorito a 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹ foi um sanitizante mais eficaz que o APA a 250 mg.L⁻¹ e 1.000 mg.L⁻¹ nas concentrações testadas. Neste trabalho, várias concentrações de APA foram testadas (dados não mostrados), porém verificou-se que uma concentração de 30 mg.L⁻¹ é suficiente para reduzir mais de cinco ciclos logarítmicos. Ainda segundo Rossini e Gaylarde (2000), APA apresentou boa atividade contra *E. coli* e *P. fluorescens*, reduzindo mais de 90 % das células aderidas numa concentração de 250 mg.L⁻¹. Entretanto, nesta mesma concentração do sanitizante, o número de *S. aureus* reduzido foi de pouco mais que 50 %. Este percentual aumentou para acima de 90 % numa concentração de 1.000 mg.L⁻¹. Hipoteticamente, o

APA age primariamente sob lipoproteínas na membrana celular e pode ser que ele seja igualmente eficaz contra lipoproteínas de membrana externa, facilitando sua ação contra células Gram negativas (LEAPER, 1984).

Um estudo realizado por Briñez et al (2006) avaliou o efeito bactericida de APA em combinação com peróxido de hidrogênio contra estirpes patogênicas e não patogênicas de *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. e *Escherichia coli* e verificaram que essa combinação foi efetiva (redução > 5 log UFC.mL⁻¹) em concentrações de 0,1 % e 10 minutos de exposição em todos os casos. Neste trabalho, essa redução foi atingida em concentração de 2 % de peróxido de hidrogênio, com 30 segundos de exposição.

A diferença na eficiência de sanitização entre APA e peróxido de hidrogênio pode ser explicada por diferenças nos mecanismos de sanitização ou pela maior reatividade de APA. O APA é um peróxido orgânico e pode penetrar mais eficientemente na célula bacteriana do que a molécula do peróxido de hidrogênio, melhorando suas propriedades de sanitização como rompimento da membrana celular e bloqueio de enzimas e sistemas de transporte dos microrganismos. Alguns microrganismos também podem ser protegidos contra peróxido de hidrogênio pela atividade da enzima catalase. Esta enzima não protege contra APA, na verdade este composto pode também inativar ou inibir a atividade catalase (KOIVUNEN e HEINONEN-TANSKI, 2005).

Segundo Andrade et al (2008), a ação bactericida dos compostos iodados deve-se ao I₂ liberado a partir dos complexos com agentes tensoativos. As soluções diluídas são usadas numa concentração entre 10 - 25 mg.L⁻¹. Porém foi observado que na concentração de 25 mg.L⁻¹ esse sanitizante não reduziu pelo menos 5 log UFC.mL⁻¹, não sendo portanto, considerado eficiente pelo método de suspensão N° 960.09 da Association of Official Analytical Chemists (BELOIAN, 1998).

As formulações comerciais do extrato de semente de “grapefruit” em geral contêm 10 % dos princípios ativos e apresentam registro internacional, no FDA e no Ministério da Agricultura, no Brasil. Na literatura científica não são encontrados trabalhos referentes a avaliações sobre as propriedades antimicrobianas desse sanitizante. Em virtude da escassez de informações científicas sobre o mesmo, acredita-se que as recomendações de uso sugeridas pelo fabricante devam ser avaliadas por testes microbiológicos apropriados, como, por exemplo, o teste de suspensão, conforme metodologias propostas pela AOAC.

Em geral, recomendam-se diluições de 1:2000 ou 1:1000 do produto comercial à temperatura ambiente para as diversas aplicações na indústria de alimentos. No presente estudo, uma concentração de 1:1500 atendeu às especificações da AOAC, reduzindo 5,9 log UFC.mL⁻¹.

Sundheim e Langsrud (1995) avaliaram a resistência natural ou adquirida de bactérias associadas com ambientes de processamento de alimentos ao sanitizante contendo extrato de semente de “grapefruit”. Os resultados revelaram que uma ampla faixa de bactérias Gram-negativas é mais resistente a esse sanitizante do que as Gram-positivas. Segundo estes autores, a concentração inibitória mínima para nove das dez estirpes Gram-negativas testadas, excedeu a recomendação mínima de concentração para uso. Duas das quatro estirpes testadas também exibiram resistência no teste de suspensão. Essas duas cepas, provavelmente usaram os componentes do sanitizante como fonte de carbono para o seu crescimento.

A resistência de microrganismos aos compostos de amônia quaternária é relatada em pesquisas (HEIR et al, 1999; AASE et al, 2000). O foco na segurança alimentar e produção de alimentos refrigerados preparados para o consumo levou a um aumento do uso deste sanitizante na indústria de alimentos. De acordo com recomendações do fabricante, uma concentração de 0,2 % é apropriada para a higienização de superfícies que entram em contato com alimentos, sendo esta recomendação comprovada nesta pesquisa.

A sobrevivência de bactéria após a limpeza e sanitização representa um perigo potencial para a indústria alimentícia e para o consumidor. A perda da atividade microbiana na presença de matéria orgânica é amplamente registrada na literatura (RODGERS et al, 2001), variando com o princípio ativo do sanitizante e linhagem desafiadora. Isto demonstra a importância de testes específicos para a escolha de produtos a serem utilizados na higienização de superfícies que entram em contato com alimentos. Além disso, a bactéria pode obter alta resistência por meio de adaptação, aquisição de elementos de resistência genética, resposta ao estresse e formação de biofilmes.

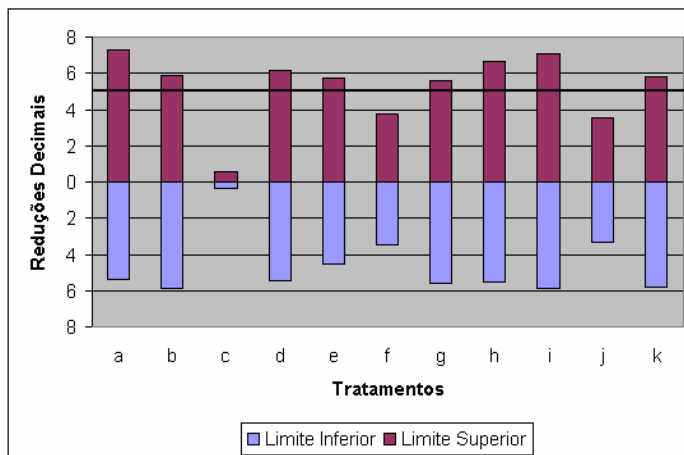


Figura 1: Resistência de *Escherichia coli* O157:H7 aos diferentes sanitizantes usados na indústria de alimentos. a) Hipoclorito de sódio 100 mg.L⁻¹, b) Hipoclorito de sódio 200 mg.L⁻¹, c) Dicloroisocianurato de sódio 100 mg.L⁻¹, d) Dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L⁻¹, e) Iodóforo 25 mg.L⁻¹, f) Peróxido de hidrogênio 1 %, g) Peróxido de hidrogênio 2 %, h) Ácido peracético 30 mg.L⁻¹, i) Extrato de semente “grape fruit” 1:1500, j) Extrato de semente “grape fruit” 1:2000 e k) Amônia quaternária 0,20 %.

3.5 CONCLUSÕES

1- Os seguintes sanitizantes foram considerados eficientes de acordo com as especificações da AOAC: hipoclorito de sódio 100 e 200 mg.L⁻¹, dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L⁻¹, peróxido de hidrogênio 2 %, ácido peracético 30 mg.L⁻¹, extrato de semente “grapefruit” 1:1500 e amônia quaternária 0,20 %.

2- A sobrevivência da bactéria após a limpeza e desinfecção representa um perigo potencial tanto para a indústria alimentícia quanto para o consumidor. Portanto, é de grande importância a realização de testes específicos para a escolha de produtos a serem utilizados na higienização de superfícies que entram em contato com alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASE, B. et al. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.62, p.57-63, 2000.

ALT, E.; LEIPOLD, F.; MILATOVIC, D. Hydrogen peroxide for prevention of bacterial growth on polymer biomaterials. **The Annals of Thoracic Surgery**, Philadelphia, v.68, p.2123-2128, 1999.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N.J. (Ed). **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008, p.185-221.

ASSELT, A.J.; GIFFEL, M.C. Pathogen resistance to sanitizers. In: LELIEVELD, H.L.M.; MOSTERT, M.A.; HOLAH, J. (Eds). **Handbook of Hygiene Control in the Food Industry**. England: Woodhead Publishing Limited, 2005. p.69-92.

BAQUERO, F.; NEGRI, M.C.; MOROSINI, M.I. Antibiotic-Selective Environments. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v.27, p.S5-S11, 1998.

BELOIAN, A. Disinfectants. AOAC Official Method 960.09. In: Association Of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists**. 16 ed., Gaithersburg, Maryland: 1998, v.1, cap.6, p.9-11.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 336, de 22 de julho de 1999. Regulamenta o Registro de Produtos Saneantes Domissanitários e Afins, de Uso Domiciliar, Institucional e profissional... **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jul. 1998. Seção 1.

BRÍÑEZ, W.J., ROIG-SAGUÉS, A.X., HERRERO, M.M.H. Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. **Food Control**, Amsterdam, v.17, p.516-521, 2006.

BROWN, M.R.W.; GILBERT, P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.74, p.87S-97S, 1993.

CHESCA, A.C. Eficácia de diferentes sanitizantes na desinfecção de alface (*Lactuca sativa*) artificialmente inoculadas. 2002. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

EATON, A.D., CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1995.

EIROA, M.N.U; PORTO, E. Evaluation of different chlorine based disinfectants and vinegar against *Vibrio cholerae* present in lettuce. **Coletânea do Ital**, Campinas, v.25, n.2, p.169-172, 1995.

EVANCHO, G.M.et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p.25-44.

HEINZEL, M. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v.41, p.225-234, 1998.

HEIR, E., SUNDHEIM, G., HOLCK, A.L. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistance staphylococci from the food industry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.48, p.211-219, 1999.

KICH, J.D., BOROWSKY, L.M., SILVA, V.S., et al. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella Typhimurium* isoladas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.32, n.1, p.33-39, 2004.

KOIVUNEN, J.; HEINONEN-TANSKI, H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. **Water Research**, Denmark, v.39, p.1519-1526, 2005.

KRAEMER, J. Cleaning and disinfection. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v.89, p.14-20, 1998.

LEAPER, S. Synergistic killing of spores of *Bacillus subtilis* by peracetic acid and alcohol. **American Journal of Food Technology**, v.19, p.355-360, 1984.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, p.147-179, 1999.

RAJALA, R.L.; PULKKANEN, M.; PESSI, M. Removal of microbes from municipal wastewater effluent by rapid sand filtration and subsequent UV irradiation. **Water Science and Technology**, London, v.47, n.3, p.157-162, 2003.

RICHARDSON, G.H. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1985.

RODGERS, J., MCCULLAGH, J.J., McNAMEE, P.T., et al. (2001). An investigation into the efficacy of hatchery disinfectants against strains of *Staphylococcus aureus* associated with the poultry industry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.82, p.131-141, 2001.

RODGERS, S.L.; CASH, J.N.; SIDDIQ, M. A comparison of different chemical sanitizers for inactivation *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, p.721-731, 2004.

ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.61, p.81-85, 2000.

RUSSELL, A.D. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.3, p.99-119, 1990.

RUSSELL, A.D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.71, p.191-201, 1991.

RUSSELL, A.D. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: RUSSELL, A.D., HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J. (Eds). **Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1999.

SETLOW, B.; LOSHON, C.A.; GENEST, P.C. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, p.362-375, 2002.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, p.167-173, 2003.

SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S. Natural and acquired resistance of bacteria associated with food processing environments to disinfectant containing an extract from grapefruit seeds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v.36, p.441-448, 1995.

SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, E.; HEIR, A.L. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v.41, p.235-239, 1998.

WEI, C.; COOK, D.L.; KIRK, J.R. Use of chlorine compounds in food industry. **Food Technology**, New Orleans, v.39, p107-105, 1985.

YOUNG, S.B., SETLOW, P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.95, p.54-67, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no primeiro capítulo sugerem que:

- *E.coli* O157 não deve ser considerada patógeno de relevância no leite cru produzido na microrregião de Viçosa, embora outros pontos analisados tenham apresentado qualidade microbiológica insatisfatória, com contagens altas de microrganismos indicadores de higiene;
- A higiene do manipulador e as práticas de ordenha devem ser melhoradas. Podem-se obter estas melhorias possibilitando um maior acesso dos proprietários e funcionários responsáveis pela ordenha à informação, educação e orientação;
- As altas contagens observadas para tetas em algumas propriedades indicaram um perigo para a contaminação do leite e poderiam ser minimizadas pela lavagem das mesmas com água contendo soluções desinfetantes;
- Para reduzir a contaminação do leite, utensílios e equipamentos usados na ordenha devem ser lavados e enxaguados com detergentes e desinfetantes imediatamente após o uso;
- A qualidade microbiológica da ração e da água deve ser monitorada, pois, se contaminados, estes serão importantes veículos para a introdução de agentes patogênicos no rebanho;
- Torna-se evidente que alguns problemas sanitários têm ocorrido na obtenção e conservação do leite e, portanto, devem ser implementadas medidas com ações que possam identificar falhas no processo de obtenção do produto e maior rigor na fiscalização pelos órgãos competentes;

- Importantes aspectos a serem considerados para melhorar a qualidade do leite são o uso da refrigeração imediatamente após a ordenha e a redução do tempo de entrega;
- Na atualidade, a ferramenta mais avançada para proteger os produtos alimentícios de perigos biológicos, físicos e químicos é o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC). Com base científica, o sistema tem por finalidade identificar perigos específicos e estabelecer medidas preventivas de controle em toda a cadeia alimentar, envolvendo a produção primária, as indústrias, os transportadores, os consumidores, os inspetores e fiscalizadores e os fornecedores de produtos e serviços de qualquer natureza que se relacione com a segurança do alimento.

As contatações observadas no segundo capítulo nos permite inferir que:

- Todas as superfícies avaliadas permitiram maior ou menor grau de adesão de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, de acordo com o tempo de contato e temperatura de exposição;
- As superfícies apresentaram características de microtopografias muito diferentes na observação por microscopia eletrônica de varredura, o que pode justificar as diferenças entre os graus de adesão observados;
- Os modelos obtidos para as três superfícies foram validados, uma vez que para todas as predições os resultados foram maiores que os valores experimentais encontrados;
- Os resultados reforçaram a importância do uso de práticas higiênicas corretas na indústria de alimentos. Dessa forma, sugere-se avaliar estes procedimentos de higienização e o uso de agentes sanitizantes mais adequados às superfícies submetidas à adesão.

As contatações observadas no terceiro capítulo nos permite inferir que:

- Os sanitizantes hipoclorito de sódio 100 e 200 mg.L⁻¹, dicloroisocianurato de sódio 200 mg.L⁻¹, peróxido de hidrogênio 2 %, ácido peracético 30 mg.L⁻¹, extrato de semente “grapefruit” 1:1500 e amônia quaternária 0,20 % foram considerados eficientes de acordo com o teste da AOAC;
- É de fundamental importância a realização de testes específicos para a escolha de produtos a serem utilizados na higienização de superfícies que entram em contato com alimentos.

ANEXOS

Tabela 1: Repetições do NMP de coliformes termotolerantes para as propriedades situadas em Porto Firme.

Porto Firme	Propriedade A				Propriedade B			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Leite 1	< 0,3	< 0,3	21,0	< 0,3	9,3	0,4	0,7	0,4
Leite 2	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,9	0,9	0,9
Teta 1	< 0,3	< 0,3	0,9	< 0,3	0,9	0,4	2,0	0,4
Teta 2	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,4	0,9	0,9
Teta 3	2,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,9	2,3	0,4	0,4
Teta 4	-	-	-	-	4,3	2,8	< 0,3	< 0,3
Teta 5	-	-	-	-	110,0	0,4	43,0	0,9
Água	0,04	< 0,03	0,93	0,23	0,15	< 0,03	0,75	0,15
Mão	2,1	< 0,3	0,4	< 0,3	0,4	< 0,3	> 110,0	< 0,3
Balde	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
F. balde	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
Latão	-	-	-	-	24	0,4	24	0,4
Teteira	-	-	-	-	> 110,0	< 0,3	9,3	9,3
Trigo/fubá	-	-	-	-	< 0,3	< 0,3	46,0	< 0,3
Soja	-	-	-	-	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3

Tabela 2: Repetições do NMP de coliformes termotolerantes para as propriedades situadas em São Miguel do Anta.

São Miguel	Propriedade C				Propriedade D			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Leite 1	7,5	< 0,3	< 0,3	< 0,3	4,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Leite 2	21,0	< 0,3	< 0,3	< 0,3	15,0	< 0,3	0,4	< 0,3
Teta 1	2,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Teta 2	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3	7,5	< 0,3	< 0,3
Teta 3	46,0	1,5	9,3	9,3	< 0,3	0,4	2,1	2,1
Teta 4	> 110,0	< 0,3	2,3	2,3	-	-	-	-
Água	0,93	< 0,03	< 0,03	< 0,03	0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Mão	9,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Balde	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
F. balde	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
Latão	0,9	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
F. latão	0,7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Teteira	-	-	-	-	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Milho	110,0	1,5	< 0,3	1,5	-	-	-	-
Soja	1,5	110,0	< 0,3	1,5	-	-	-	-
Soja/Fubá	-	-	-	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Cana	-	-	-	-	> 110,0	> 110,0	> 110,0	> 110,0

Tabela 3: Repetições do NMP de coliformes termotolerantes para as propriedades situadas em Viçosa.

Viçosa	Propriedade E				Propriedade F			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Leite 1	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,4	< 0,3
Leite 2	0,4	< 0,3	0,9	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,4	< 0,3
Teta 1	2,1	1,1	< 0,3	< 0,3	0,9	7,5	1,1	2,8
Teta 2	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	7,5	4,3	0,7	< 0,3
Teta 3	2,3	< 0,3	24,0	< 0,3	0,9	24,0	< 0,3	< 0,3
Teta 4	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
Teta 5	0,4	< 0,3	2,3	0,9	-	-	-	-
Água	> 11,0	> 11,0	> 11,0	0,03	0,15	< 0,03	0,23	< 0,03
Mão	0,9	21,0	< 0,3	0,7	0,9	2,1	1,5	< 0,3
Balde	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,3	< 0,3	< 0,3
F. balde	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,9	< 0,3	< 0,3
Latão	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
F. latão	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Milho	9,0	23,0	< 3,0	< 0,3	-	-	-	-
Soja/Milho	-	-	-	-	> 1100,0	240,0	1100,0	11,0

Tabela 4: Repetições do NMP de coliformes termotolerantes para as propriedades situadas em Coimbra.

Coimbra	Propriedade G				Propriedade H			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Leite 1	< 0,3	0,4	< 0,3	0,4	9,3	< 0,3	1,1	< 0,3
Leite 2	< 0,3	0,9	< 0,3	< 0,3	4,3	0,4	0,3	< 0,3
Teta 1	< 0,3	< 0,3	2,3	2,8	< 0,3	< 0,3	0,3	< 0,3
Teta 2	0,7	< 0,3	< 0,3	> 110,0	< 0,3	21,0	< 0,3	0,9
Teta 3	< 0,3	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,3	2,3	< 0,3	< 0,3
Teta 4	-	-	-	-	< 0,3	< 0,3	1,4	< 0,3
Teta 5	-	-	-	-	< 0,3	15,0	< 0,3	< 0,3
Teta 6	-	-	-	-	< 0,3	21,0	< 0,3	< 0,3
Teta 7	-	-	-	-	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,3
Água	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Mão	< 0,3	0,7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	> 110,0	0,3	< 0,3
Latão	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
F. latão	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
Teteira	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,3	< 0,3
Ração	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	21,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0

Tabela 5: Repetições do NMP de coliformes termotolerantes para as propriedades situadas em Paula Cândido.

Paula Cândido	Propriedade I				Propriedade J			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Leite 1	2,3	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Leite 2	2,3	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Teta 1	> 110,0	< 0,3	9,3	9,3	1,1	110,0	110,0	1,1
Teta 2	24,0	0,9	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,3
Teta 3	0,9	0,9	0,4	0,4	110,0	< 0,3	2,3	2,3
Teta 4	24,0	< 0,3	0,9	< 0,3	0,4	2,3	< 0,3	< 0,3
Teta 5	-	-	-	-	< 0,3	2,3	0,4	< 0,3
Teta 6	-	-	-	-	0,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Água	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Mão	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,3	2,8	< 0,3	0,4	0,4
Latão	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	-	-	-	-
F. latão	2,3	< 0,3	0,4	< 0,3	-	-	-	-
Teteira	0,4	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Ração	4,0	< 3,0	< 3,0	4,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0