

VALÉRIA COSTA SALUSTIANO

ISOLAMENTO, RIBOTIPAGEM E CONTROLE DE *Bacillus cereus*
APÓS A PASTEURIZAÇÃO DO LEITE

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
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

T

S181i
2007 Salustiano, Valéria Costa, 1976-
Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus*
após a pasteurização do leite / Valéria Costa Salustiano.
– Viçosa, MG, 2007.
xiv, 75f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Nélio José de Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 65-73

1. Leite - Pasteurização. 2. Leite - Contaminação.
3. *Bacillus cereus*. 4. Indústria de laticínios - Aspectos
sanitários. 5. Alimentos - Análise. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 637.1

VALÉRIA COSTA SALUSTIANO

ISOLAMENTO, RIBOTIPAGEM E CONTROLE DE *Bacillus cereus*
APÓS A PASTEURIZAÇÃO DO LEITE

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: 13 de agosto de 2007.

Prof^a Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo
(Co-Orientador)

Prof. José Ivo Ribeiro Júnior
(Co-Orientador)

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho

Prof^a Cláudia Lúcia Oliveira Pinto

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

Ofereço

*Aos meus queridos pais Alonso e Conceição,
pela dádiva da vida e
por sempre terem me amado.*

“A provação vem não só para testar o nosso valor,
mas para o aumentar; o carvalho não é apenas
testado, mas enrijecido pelas tempestades.”

Lettie Cowman

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora das Graças, por terem me mostrado o caminho e me dado condições para finalizar este trabalho.

Aos meus pais Alonso e Conceição, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos, sempre acreditando em mim.

Às minhas irmãs Alina e Flávia, que, mesmo distantes de mim em certo período da minha vida, sei que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos meus sobrinhos Leonardo e Larissa e ao meu cunhado Ulisses, pelo carinho e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelas facilidades oferecidas para a realização deste trabalho e pela acolhida durante esta etapa de minha vida.

À FAPEMIG, pelo apoio à minha pesquisa.

Ao Prof. Nélio José de Andrade, pela orientação, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela amizade e pelo enorme exemplo profissional.

À Prof^a Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo, pelo apoio, pelo incentivo e sugestões e pela confiança, além da grande amizade.

À Prof^a Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela atenção, ajuda e pelas contribuições ao meu trabalho.

Ao Prof. José Ivo Ribeiro Júnior, pela grande contribuição e auxílio na realização deste trabalho.

À Prof^a Ana Íris Mendes Coelho, por ter autorizado que parte do experimento fosse realizada no Laboratório de Microbiologia e Higiene do Departamento de Nutrição.

Ao Prof. Luis Antonio Minim, pela atenção e pelo auxílio prestado.

Aos meus amigos e companheiros, pelos momentos que compartilhamos e pela ajuda. Em especial, ao meu amigo João e às minhas amigas Joelma, Júnia, Lívia, Patrícia Bernardes, Patrícia Fernandes e Roberta, pelo carinho e apoio dedicados a mim até nos momentos mais difíceis desta minha trajetória.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

VALÉRIA COSTA SALUSTIANO, filha de Alonso Salustiano Pereira e Maria Conceição Costa Pereira, nasceu em 18 de novembro de 1976, em Anápolis, Goiás.

Em fevereiro de 2000, graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal de Goiás, ingressando, em seguida, no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, concluindo-o em março de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, submetendo-se à defesa da tese em agosto de 2007.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Leite pasteurizado: qualidade e contaminação por <i>Bacillus cereus</i>	3
2.2. Higienização na Indústria de laticínios e adesão bacteriana em superfícies de equipamentos.....	13
2.3. Identificação e rastreamento de <i>Bacillus cereus</i> em laticínios..	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Análise da contaminação por <i>Bacillus cereus</i> em leite e em superfícies de equipamentos na indústria de laticínios	30
3.2. Ribotipagem de <i>Bacillus cereus</i> isolados de superfícies pós-pasteurização do leite e do leite pasteurizado e determinação da carga elétrica superficial dos ribogrupos	35
3.2.1. Ribotipagem de isolados de <i>Bacillus cereus</i>	35

	Página
3.2.2. Determinação da carga elétrica superficial dos ribogrupos de <i>Bacillus cereus</i>	39
3.3. Avaliação em uso simulado de procedimentos de higienização CIP (<i>Cleaning In Place</i>) no controle de células de <i>Bacillus cereus</i> aderidas à superfície de aço inoxidável.....	41
3.4. Análise dos resultados	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Análise da contaminação por <i>Bacillus cereus</i> em superfícies e em leite pasteurizado	48
4.1.1. Análise da contaminação de leite pasteurizado por <i>Bacillus cereus</i>	48
4.1.2. Análise da contaminação por <i>Bacillus cereus</i> em superfícies pós-pasteurização	51
4.2. Rastreabilidade de <i>Bacillus cereus</i> em superfícies pós-pasteurização e no leite pasteurizado e determinação da carga elétrica superficial dos ribogrupos.....	55
4.3. Avaliação em uso simulado de procedimentos de higienização CIP (<i>Cleaning In Place</i>) no controle de células aderidas de <i>Bacillus cereus</i> em aço inoxidável.....	57
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE	74

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Componentes da tensão superficial de líquidos a 25 °C	18
2. Superfícies amostradas pela técnica do <i>swab</i> na linha de produção de leite pasteurizado tipo C e respectivas áreas amostradas.....	31
3. Procedimento operacional padrão utilizado para procedimentos CIP e para a máquina de envase na indústria de laticínios estudada.....	34
4. Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) de higienização dos tubos de prova aderidos com <i>Bacillus cereus</i>	44
5. Isolados de <i>Bacillus</i> sp. em leite e em superfícies pós-pasteurização na indústria de laticínios.....	49
6. Ribotipos de <i>Bacillus cereus</i> encontrados em superfícies pós-pasteurização do leite	56
7. Médias das cargas elétricas superficiais (%) dos ribogrupos de <i>Bacillus cereus</i> analisados em resinas catiônica e aniônica	57
8. Número de células de <i>Bacillus cereus</i> (UFC-cm ⁻²) aderidas ao aço inoxidável 304, nº 4, após diferentes procedimentos de higienização, em cinco repetições.....	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Ângulo de contato (θ) entre uma gota e uma superfície plana e horizontal. As tensões superficiais da superfície do sólido, do líquido em equilíbrio com o vapor e superfície e líquido, respectivamente, γ_S , γ_{LV} e γ_{SL}	17
2. Fotografias de parte dos equipamentos amostrados: rosca da tubulação da máquina de envase (a), tanque de equilíbrio da máquina de envase (b), tubo formador da embalagem (c), tubo de envase (d) e tanque de leite pasteurizado (e)	33
3. <i>Sistema RiboPrinter®</i> da <i>DuPont Qualicon Company</i> , do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Universidade Federal de São Paulo, SP	35
4. Culturas <i>overnight</i> e preparo das amostras para a ribotipagem automatizada no <i>Sistema RiboPrinter®</i>	36
5. a) <i>Kit</i> de análise da <i>Verus Madasa</i> , específico para o <i>Sistema RiboPrinter®</i> ; e b) <i>Kit</i> inserido no equipamento de ribotipagem ...	36
6. Inserção das amostras de isolados de <i>Bacillus cereus</i> , previamente preparadas, no <i>Sistema RiboPrinter®</i>	37
7. Funcionamento do <i>Sistema Ribo Printer®</i> (<i>Qualicon Company</i>) ...	38
8. Análise da carga elétrica superficial de isolados de <i>Bacillus cereus</i> , por meio de colunas cromatográficas	40

9. Tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento nº 4, com 33 cm de comprimento, diâmetro de 3,1 cm e extremidades fechadas com tampas rosqueáveis	41
10. Movimentos rotatórios, no sentido longitudinal para baixo (a1), longitudinal para cima (a2), lateral para a esquerda (b1), lateral para a direita (b2) e tipo baliza (c).....	43
11. a) Haste de aço inoxidável com disco de neopreno (3,25 cm de diâmetro) em uma das extremidades e b) detalhe do disco de neopreno	45
12. Esquema ilustrativo da metodologia de análise seguida para a avaliação da prevalência de <i>Bacillus cereus</i> em superfícies e no leite pasteurizado, ribotipagem dos isolados, análise de carga elétrica superficial e avaliação dos procedimentos de higienização nos tubos de prova	46
13. Estimativas das incidências de <i>Bacillus cereus</i> no leite pasteurizado tipo C durante nove semanas de monitoramento na indústria.....	50
14. Estimativa da incidência de <i>Bacillus</i> sp. nas superfícies testadas na indústria de laticínios durante as nove semanas de monitoramento	53
15. Número de <i>Bacillus cereus</i> (UFC·cm ⁻²) remanescentes nas superfícies de tubos de prova após diferentes procedimentos de higienização	59

RESUMO

SALUSTIANO, Valéria Costa, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite.** Orientador: Nélio José de Andrade. Co-Orientadores: Nilda de Fátima Ferreira Soares, Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo e José Ivo Ribeiro Júnior.

A recontaminação pós-pasteurização do leite por *Bacillus cereus* foi avaliada por análises do produto e de superfícies previamente higienizadas. As amostras de leite foram coletadas durante nove semanas, e as superfícies rosca da tubulação da máquina de envase (RT), tanque de equilíbrio da máquina de envase (TEM), tubo formador da embalagem (TFE), tubo de envase (TE) e tanque de leite pasteurizado (TLP) foram amostradas, usando-se *swabs*. Isolados característicos em MYP, Gram-positivos, foram confirmados bioquimicamente. *Bacillus cereus* confirmados foram ribotipados e tiveram suas cargas elétricas superficiais determinadas por cromatografia de interação eletrostática. Além disso, quatro procedimentos de higienização diferentes para o controle da adesão bacteriana ao aço inoxidável foram avaliados. Dos 115 isolados de *Bacillus* sp., 35,65% foram encontrados no leite e 64,35%, nas superfícies. Foram definidos como *B. cereus* 30 isolados das superfícies e 12 do leite. Logo após o envase do leite pasteurizado, a contagem de *Bacillus* sp. variou de

- 0,349 a 1,85 log UFC·mL⁻¹, com média de 0,588 log UFC·mL⁻¹. Na primeira semana de monitoramento, o número de *Bacillus* sp. atingiu o limite superior de controle (LSC) de 1,22 log UFC·mL⁻¹, e na sétima semana a contaminação do leite ultrapassou esse valor. Para as superfícies, as contagens microbianas situaram-se entre 0,061 e 1,977 log UFC·cm⁻², com média de 0,646 log UFC·cm⁻². A contaminação por *Bacillus* sp. estava fora de controle nas duas primeiras semanas em praticamente todas as superfícies testadas após os POPs. No TLP houve elevação ao longo das semanas, e na sétima o processo foi considerado fora de controle, o que indica a necessidade de se fazerem o monitoramento e o controle, quando necessário. Constatou-se que a eficiência ou não da higienização em superfícies de equipamentos em uma semana não influenciou o resultado da higienização na semana seguinte. Assim, todos os locais avaliados são passíveis de controle, com execução de procedimentos de limpeza e sanitização adequados. Sete ribogrupos foram encontrados, e um mesmo ribogrupos foi isolado de quatro superfícies e de amostras de leite pasteurizado, indicando que as superfícies são reservatórios de *B. cereus*. Apenas o TE não foi associado à recontaminação, e os ribogrupos apresentaram-se predominantemente aniônicos. Analisando as contagens microbianas nas superfícies após a aplicação dos diferentes procedimentos, verificou-se que a adesão de *B. cereus* foi afetada pela temperatura, concentração da solução alcalina, uso ou não da solução ácida e pelo pH da solução clorada. A indústria deve enfatizar os procedimentos de higienização e sua operacionalização, controlando pH, concentração, temperatura e tempo de contato das soluções. Além disso, é importante monitorar o processo, para que ações corretivas possam ser desenvolvidas quando necessárias.

ABSTRACT

SALUSTIANO, Valéria Costa, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2007. ***Bacillus cereus* isolation, ribotyping and control in post-pasteurized milk.** Adviser: Nélío José de Andrade. Co-Advisers: Nilda de Fátima Ferreira Soares, Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo and José Ivo Ribeiro Júnior.

Bacillus cereus recontamination of post-pasteurized milk was assessed by product analysis and by previously sanitized surfaces analysis. The milk samples were collected during nine weeks and the surfaces of the packaging machine screw (PMS); of the packaging machine leveling tank (PMLT); of the package forming tube (PFT); of the packaging tube (PT), and of the pasteurized milk storage tank (PMST) were verified using surface swabs. Gram-positive were isolated on MYP and biochemically confirmed. The *Bacillus cereus* isolates were ribotyped and had their superficial electrical charge evaluated using electrostatic interaction chromatography. Furthermore, four different cleaning procedures to control bacterial adhesion to stainless steel surfaces were assessed. From 115 *Bacillus* sp. isolates, 35.65 % were from milk and 64.35 % were from stainless steel surfaces. Thirty isolates from surfaces and 12 isolates from milk were characterized as *Bacillus cereus*. Just after pasteurized milk packaging *Bacillus* sp. numbers varied from $-0.349 \log \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $1.85 \log \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, with $0,588 \log$

UFC·mL⁻¹ average. During the monitoring process, at the first and seventh weeks, the milk contamination reached or surpassed the upper control limit of 1.22 log UFC·mL⁻¹ (UCL). For the surfaces, the microbial numbers were between – 0.061 log UFC·cm⁻² and 1,977 log UFC·cm⁻², with 0.646 log UFC·cm⁻². The *Bacillus* sp. contamination was out of control in the two first weeks practically for all studied surfaces after Standard Operational Procedures. The PMST showed a tendentious elevation and in the seventh week surpassed the UCL, standing out of control, indicating control and monitoring necessity at this critical point. After the statistical analysis, was verified a positive data autocorrelation, wich indicated the efficiency/deficiency of one week sterilization influenced the next week results for three surfaces. PMLT and PFT showed inconclusive results. The results showed a tendency, according to Durbin Watson test (P<0.05), during the weeks for PMS, PMLT, PMST surfaces, being the *Bacillus* sp. contamination predictable. Therefore, the monitoring process is important for the control, when the numbers start to rise. For the non tendentious surfaces, the monitoring is still important; the process could run out of control suddenly. Seven ribogroups were found and the same ribogroup was isolated from four surfaces and from pasteurized milk, what meant they were *Bacillus cereus* reservoirs. Only the PT was not associated with recontamination. The ribogroups were predominantly anionics (P<0.05) by F test. Analyzing the surfaces, microbial numbers after using different procedures, were verified that *Bacillus cereus* adhesion was affected by the alkaline solution temperature and concentration, by the use or not of acid solution and by chlorine solution pH. The industry must emphasize “how to do” the cleaning procedures and its performing, controlling the pH, the concentration, the temperature and the exposure time of the solutions. Also it is important “how to assess” for the process monitoring in order to corrective actions may be conducted when necessary.

1. INTRODUÇÃO

A recontaminação do leite pasteurizado por *Bacillus cereus* na linha de produção leva à perda de qualidade, diminuição da vida útil do produto e, eventualmente, a riscos à saúde do consumidor.

Espécies de *Bacillus*, dentre elas *B. cereus* e outros microrganismos Gram-positivos, como espécies do gênero *Micrococcus*, e de Gram-negativos, como *Pseudomonas* sp., são os principais recontaminantes após o tratamento térmico do leite. A redução de qualidade em leite e produtos lácteos processados é geralmente consequência do crescimento e de atividades metabólicas dessas bactérias recontaminantes, particularmente ao se reproduzirem sob temperaturas de refrigeração, caracterizando-se como psicotróficas.

A presença da forma esporulada de *B. cereus* no leite cru, como consequência de condições higiênicas insatisfatórias no processo de ordenha, resiste à pasteurização e pode formar biofilmes nas superfícies dos equipamentos da linha de processamento. Uma vez que os microrganismos estejam aderidos ou formem biofilmes nos equipamentos, haverá resistência à remoção pelos procedimentos normais de higienização.

O objetivo geral deste trabalho foi rastrear os reservatórios de *Bacillus cereus* em pontos de pós-pasteurização de leite. Já os objetivos específicos da pesquisa foram: i) avaliar a contaminação do leite pasteurizado e de superfícies de processamento por *Bacillus* sp.; ii) isolar e identificar os

isolados característicos de *Bacillus cereus*; iii) ribotipar os isolados de *Bacillus cereus*; iv) determinar a carga elétrica superficial dos ribogrupos; e v) avaliar procedimentos de higienização diferentes para o controle de adesão de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável, AISI 304 , nº 4.

Dessa maneira, procurou-se fornecer subsídios às indústrias de laticínios para o controle da recontaminação do leite pasteurizado por *B. cereus*, após o processo de pasteurização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leite Pasteurizado: qualidade e contaminação por *Bacillus cereus*

De modo semelhante a muitas situações relatadas na História, segundo Leite et al. (2006), o acaso e a necessidade de sobrevivência fizeram com que o homem identificasse, ainda na Antigüidade, a importância do leite como fonte nutricional. O consumo desse alimento por civilizações mais antigas está comprovado em pelo menos cinco citações no Antigo Testamento: Gênesis 18:8, I Samuel 17:18, II Samuel 17:29, Jó 10:10 e Provérbios 30:31, mas, evidentemente, naquela época ainda não se conhecia uma forma eficiente para a conservação desse produto.

Durante muito tempo, o leite foi consumido por quem o produzia e não tinha valor comercial, em virtude de sua rápida deterioração. Há registros de que a primeira fábrica de laticínios da América do Sul foi fundada por volta de 1888, na Serra da Mantiqueira, em Minas Gerais, pelo Dr. Carlos Pereira de Sá. Após o surgimento em outros estados de novas fábricas desse setor, sentiu-se a necessidade de divulgação do que era feito no Brasil na área de Laticínios. Isso ocorreu em 1925, por ocasião da realização da 1ª Conferência Nacional de Leite e Laticínios, no Rio de Janeiro. Nessa conferência, procurou-se enfatizar a importância do leite para a saúde e o valor dos métodos científicos e técnicos aplicáveis à sua industrialização.

Aproveitou-se a ocasião para fazer uma campanha educativa sobre higiene na indústria de laticínios (LEITE et al., 2006).

A partir de então, segundo Leite et al. (2006), tem-se procurado melhorar a qualidade microbiológica do leite por meio da manutenção de rebanho saudável e ações efetivas de boas práticas de higiene, manuseio do leite, durante e após a ordenha, e higienização correta dos equipamentos e utensílios utilizados.

O termo “pasteurização” pode simplesmente se referir ao tratamento térmico, tipicamente por 15 segundos a uma temperatura maior que 71,8 °C, seguido de imediato resfriamento, ou pode fazer alusão ao processo comercial completo. Neste último caso, o processo de pasteurização incluiria o tratamento térmico e medidas para assegurar um produto seguro, o controle da cadeia de resfriamento após o tratamento térmico e a prevenção da recontaminação do leite pasteurizado, que levaria à deterioração do produto (MUIR, 2004).

A pasteurização, segundo a Comissão do *Codex Alimentarius* da Organização Mundial de Saúde (OMS), foi estabelecida com a finalidade de reduzir ao mínimo os riscos para a saúde, associados a microrganismos patogênicos como *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetti* (LOPES; STANFORD, 1997). Conservando os alimentos por inativação de suas enzimas e destruição de microrganismos relativamente termolábeis, a pasteurização leva a perdas mínimas no valor nutritivo e nas características sensoriais do alimento em questão. Consiste em um tratamento térmico suave, utilizando temperaturas geralmente inferiores a 100 °C, com vistas a prolongar a vida útil dos alimentos por vários dias ou meses (FELLOWS, 1994).

A deterioração de origem microbiana é a causa mais comum de perdas de produtos e pode manifestar-se visivelmente, formando limosidades e colônias, mudanças de textura do alimento por degradação de polímeros ou odores e sabores indesejáveis (GRAM et al., 2002).

A perda de produtos devida à deterioração microbiana representa um grande problema para o mercado de laticínios e acarreta grandes prejuízos econômicos. A utilização de leite de baixa qualidade microbiológica, pela indústria, também tem implicações tecnológicas relevantes, que apresenta

como conseqüências perdas econômicas e riscos à saúde do consumidor. No Brasil praticamente não existem levantamentos epidemiológicos que demonstrem com segurança a incidência e a gravidade de doenças de origem alimentar, mas trabalhos científicos têm evidenciado o elevado número de amostras de leite pasteurizado fora dos padrões microbiológicos brasileiros (NERO et al., 2005).

Considerando essas evidências de que o leite produzido e consumido no Brasil nem sempre apresenta a qualidade desejada, foi publicada em 18 de setembro de 2002 a Instrução Normativa nº 51 (IN51), que determinou novas normas na produção, identidade e qualidade de leites pasteurizados tipos A, B e C, e em leite cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Uma das principais alterações foi a respeito do leite pasteurizado padronizado: esse processamento não possuía parâmetros microbiológicos específicos. De acordo com as novas normas, esse leite “deve ser refrigerado já na propriedade e possuir uma contagem máxima de aeróbios mesófilos de 10^6 UFC·mL⁻¹, objetivo a ser atingido em diferentes prazos, de acordo com a localização geográfica da região produtora, até no máximo julho de 2007” (BRASIL, 2002).

Por sua riqueza de nutrientes, o leite é considerado um alimento quase completo para os humanos, sendo amplamente comercializado e consumido pela população. Contém lactose, triacilgliceróis e outros lipídios, em estruturas globulares estabilizadas por uma membrana protéica, e partículas pequenas compostas de um grupo de fosfoproteínas conhecidas como caseínas, além de algumas proteínas globulares na fração aquosa (LAWRENCE et al., 2002). Sua composição oferece condições excelentes para a multiplicação de microrganismos, em curto espaço de tempo (GARRIDO et al., 2001).

Gounot (1986) e Silva (1991) observaram que os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem em ampla faixa de temperatura. Essa microbiota inclui, além dos mesófilos, microrganismos termófilos e psicrotróficos.

Segundo Hayes e Boor (2001), no leite estão presentes bactérias psicrotróficas, as termodúricas (que podem sobreviver ao tratamento térmico

da pasteurização), as lácticas (que acidificam rapidamente o leite cru não-refrigerado), os coliformes e as bactérias patogênicas.

Os principais microrganismos relacionados com a alteração da qualidade do leite compreendem os mesófilos e os psicrotróficos, em que o segundo grupo engloba vários tipos de microrganismos capazes de produzir alterações físicas, químicas e sensoriais no leite (SPEXOTO et al., 2005). Organismos psicrotróficos formadores de esporos, do gênero *Bacillus*, despertaram interesse considerável no processamento de leite, pelo fato de também serem termodúricos e resistirem ao tratamento de pasteurização do produto (ROBINSON, 1990).

Segundo Collins (1981), de acordo com as normas da *International Dairy Federation*, os psicrotróficos foram definidos como os microrganismos que podem crescer a 7 °C ou menos, independentemente da temperatura ótima de crescimento. Esse grupo é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos relativamente longos, de uma a quatro semanas.

O problema torna-se ainda mais sério quando se considera que o uso intensivo da refrigeração no leite, desde a fazenda até a residência do consumidor, pode provocar uma gradativa seleção para esse grupo. Tem-se observado que grande número de espécies, antes consideradas estritamente mesófilas, vem sendo incluída também entre os psicrotróficos (COLLINS, 1981; FONSECA et al., 2006).

Estudos realizados por Meer et al. (1993) revelaram que a microbiota do leite tratado termicamente e estocado sob refrigeração consistia de 83% de *Bacillus*, indicando que os microrganismos mais resistentes são bactérias aeróbias ou facultativas, formadoras de esporos. Os dados confirmam a importância do grupo de microrganismos denominado “termodúricos”, que não é caracterizado pela temperatura de crescimento, mas sim pela sua resistência térmica. São microrganismos capazes de sobreviver ao tratamento comumente utilizado na pasteurização do leite, ou seja, 72 °C por 15 segundos ou 65 °C por 30 minutos. Assim, a grande importância desse grupo pode ser avaliada na conservação de produtos pasteurizados, ainda mais porque espécies desse grupo têm sido encontradas entre os psicrotróficos, como *Bacillus cereus*.

A aceitação do leite fluido por parte do consumidor depende, em grande parte, das suas características sensoriais, como sabor e aroma, assim como do seu valor nutricional, atributos esses que podem ser alterados pelas ações proteolítica e lipolítica de bactérias psicrotróficas, com prejuízos no tempo de vida de prateleira e na qualidade do leite pasteurizado (MA et al., 2000).

A vida de prateleira de um alimento pode ser definida como o período decorrido desde o momento em que se concluem as operações de embalagem, incluindo as etapas de comercialização, com estocagem, transporte, manuseio, até o momento em que as características sensoriais e de sanidade do produto se tornem inadequadas para a alimentação. Por ser um alimento complexo e de alto valor biológico, a vida de prateleira do leite de consumo depende pouco da qualidade da embalagem e sim das características sanitárias envolvidas na produção, manuseio, processamento e distribuição (FORSYTHE, 2002).

Os consumidores esperam que os alimentos de qualidade sejam nutritivos e saborosos, ainda que permaneçam bem sob refrigeração (RALYEA et al., 1998). O conceito de qualidade do ponto de vista da Ciência e Tecnologia de Alimentos é mais objetivo, com base na comparação das características dos produtos com padrões preestabelecidos. Para manter ou aumentar as ações do mercado, entretanto, as metas da indústria de laticínios devem ir de encontro às expectativas de qualidade dos consumidores. Visando alcançar esses desafios, a indústria deve focar a qualidade e extensão da vida útil de seus produtos (BOOR, 2001).

Boor, em seu laboratório na Universidade de Cornell, Estados Unidos, tem mostrado que a maioria dos microrganismos deterioradores, isolados após o processamento de produtos lácteos, é constituída de Gram-positivos e esporulantes, incluindo *Bacillus* spp. Esses organismos não são tipicamente isolados do leite na ordenha e parecem contaminar o alimento pelo contato com superfícies contaminadas, freqüentemente afetando a extensão da vida útil do produto (BOOR, 2003).

Muitos pesquisadores acreditam que a contaminação do leite pasteurizado por *Bacillus* spp. resulta da sobrevivência de esporos que estariam presentes no leite *in natura*. Entretanto, outros dados da literatura

indicam que a contaminação pós-processamento contribui, de forma relevante, para aumentar as contagens microbianas no produto (SCHRAFT et al., 1996). Johnston e Bruce (1982) mencionaram que a contagem de esporos em amostras de leite pasteurizado pode ser maior do que em amostras de leite cru. Isso pode ser devido à contaminação com esporos do equipamento, em virtude das falhas de higienização nas usinas. As bactérias esporulantes estão presentes usualmente em pequeno número, quando o leite é ordenhado em boas condições sanitárias.

Entre as espécies do gênero *Bacillus*, uma das mais importantes para a indústria de laticínios é *B. cereus*, tendo em vista sua capacidade de produzir toxinas, enzimas extracelulares, que determinam o potencial de deterioração, e esporos, que podem resistir ao tratamento térmico. Esse microrganismo está intimamente envolvido com a vida de prateleira do leite pasteurizado (MARTINS et al., 2005).

Crielly et al. (1994) citaram que a incidência de *B. cereus* no leite é maior no período de verão, ao passo que *B. licheniformis* é mais comum no período de inverno.

Segundo Wong et al. (1988), entretanto, apesar da alta incidência desse microrganismo em produtos lácteos, as intoxicações alimentares causadas por ingestão de leite ou derivados são raras. Assim, o principal problema da presença de *B. cereus* no leite é sua influência como fator limitante da vida de prateleira do produto e o desenvolvimento de atributos sensoriais indesejáveis (FROMM; BOOR, 2004). Brown (2000) referiu a *Bacillus cereus* como microrganismo causador de perdas econômicas importantes para a indústria de laticínios.

Sutherland (1993) também demonstrou que *B. cereus* é a bactéria esporulante mais importante na alteração do leite pasteurizado estocado em temperaturas de 6 °C a 20 °C.

Cepas de *B. cereus* são capazes de utilizar vários carboidratos: glicose, frutose, trealose, sacarose, salicina, maltose, manose, m-inositol e lactose. São capazes de hidrolisar amido, caseína e gelatina. Todas são produtoras de hemolisinas e também produtoras de fosfolipases do tipo C (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Segundo Collins (1981), a bactéria é capaz de produzir proteases e fosfolipases extracelulares termorresistentes, resultando na coagulação doce e no sabor amargo do leite pasteurizado.

A atividade enzimática devida à presença dessa bactéria nos produtos lácteos foi demonstrada por Silveira et al. (1999). As enzimas lipolíticas produzidas por *B. cereus* causam a hidrólise de gorduras e a produção de ácidos graxos livres após a germinação de esporos no leite. Essas enzimas microbianas são específicas e muito mais ativas do que as lipases naturais.

A lipólise resulta da ação de lipases naturais e, ou, microbianas, enzimas que têm a propriedade de hidrolisar os triacilgliceróis da gordura, liberando ácidos graxos de cadeia curta, como butírico, capríco, caprílico e cáprico, que são os principais responsáveis pelo aparecimento de odores e sabores desagradáveis no leite. As lipases naturalmente presentes no leite são termossensíveis, facilmente destruídas pelas temperaturas de pasteurização, não causando danos à matéria graxa de um leite manuseado e processado adequadamente. Entretanto, as lipases microbianas podem causar alterações na gordura do leite, após o processamento térmico, uma vez que são resistentes à temperatura de pasteurização e permanecem ativas em temperaturas muito baixas (GOMES, 1988). Valores de ácidos graxos livres acima de $1,3 \text{ meqL}^{-1}$ em leite bovino geralmente tornam o produto inaceitável para o consumo (FONSECA et al., 2006).

Como as lipases são largamente produzidas pelos microrganismos no final da fase lag e no início da fase estacionária, não há correlação direta entre o número de células e a concentração da enzima. Os defeitos nos produtos são detectados quando a concentração de *Bacillus* lipolíticos atinge entre 5×10^5 e $10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ (JANSTOVÁ et al., 2006). Em contraste, uma concentração de $2,7 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de microrganismos psicrotróficos foi suficiente para iniciar um processo de lipólise em leite, como observado por Silveira et al. (1999).

Os principais produtos químicos descritos na literatura como responsáveis pela deterioração do leite e resultantes do metabolismo de *B. cereus* sobre os fosfolípidios são proteínas, partículas de gordura e ésteres. Esses produtos do metabolismo bacteriano provocam odor indesejável, denominado *odor adocicado de frutas* (GRAM et al., 2002).

As proteases podem atuar sobre as proteínas do leite, causando também o desenvolvimento de gosto amargo e a coagulação do leite. No leite, há diversas enzimas de origem microbiana que têm a capacidade de hidrolisar proteínas (SHAH, 1994). Proteases termorresistentes produzidas por algumas espécies de *Pseudomonas* e de *Bacillus* podem alterar leites esterilizados (FRANK et al., 1992; BRASIL, 1993; COLLINS et al., 1993).

As enzimas proteolíticas, ou proteases, incluem as proteinases, que promovem a hidrólise da molécula de proteína em polipeptídios, e as peptidases, que hidrolisam estes fragmentos a aminoácidos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Essas enzimas têm ação sobre as proteínas do leite, principalmente sobre as caseínas, liberando peptídeos responsáveis pelo gosto amargo do leite (FORSYTHE, 2002).

Capazes de hidrolisar toda a caseína disponível no leite a peptídeos solúveis, as proteases tem efeito direto nas características sensoriais do produto. As proteases de bactérias psicotróficas apresentam capacidade de coagular a proteína do leite e possuem atividade hidrolítica em várias frações da caseína, apresentando, no entanto, baixa atividade degradativa sobre as proteínas do soro. A fração protéica representada pela caseína é facilmente degradada devido à sua estrutura não helic

presença de *Bacillus cereus* em 29,2% das 11 amostras positivas (18,3%) para *Bacillus* sp. e concluiu que a sua presença poderia ser atribuída à recontaminação após o tratamento térmico. Foschino et al. (1990) encontraram baixa concentração de *Bacillus cereus* (3,1%) em amostras de leite UAT positivas para microrganismos do gênero *Bacillus*. Zacarchenco et al. (2000), analisando 100 amostras de leite UAT processados pelos métodos de injeção direta e indireta de vapor, verificaram que 22% das amostras processadas pelo sistema direto e 71,4% pelo indireto apresentavam *Bacillus* sp. na forma de esporos de alta resistência térmica (HHRS – *Highly Heat Resistant Spores*). Os HHRS pareceram resistir às condições de tempo e temperatura empregadas, principalmente no sistema de injeção indireta de vapor, trazendo preocupação pela possibilidade de prejuízos, com condenação do produto (MARTINS et al., 2005).

Ravanis e Lewis (1995) afirmaram que, mesmo no produto final, ou seja, no leite pasteurizado, com uma contagem bacteriana dentro dos padrões legais, a deterioração por ação de lipases e proteases de origem microbiana pode ocorrer. Também, segundo Collins (1981), as lipases e proteases, mesmo em baixas concentrações, são capazes de degradar gordura e proteína causando, respectivamente, sabor de ranço e sabor amargo no leite e produtos lácteos estocados sob refrigeração.

Segundo Fonseca et al. (2006), o controle de microrganismos psicrótróficos no leite é fundamental para sua qualidade, pois a atividade metabólica desses microrganismos leva a alterações bioquímicas nos constituintes do leite, as quais limitam a vida de prateleira dos produtos.

A pasteurização do leite cru causa aumento na atividade proteolítica e uma queda na atividade lipolítica. As lipases produzidas pelos psicrótróficos são mais importantes no desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma em queijos do que as proteases; isso porque as proteases são solúveis em água e são perdidas no soro, enquanto as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo (GOMES, 1988).

A recontaminação do leite pasteurizado, segundo Aantrekker et al. (2002), pode ocorrer por diferentes rotas. As bactérias aderem a superfícies de equipamentos, podendo formar biofilmes, que consistem em um aglomerado de bactérias e seu material extracelular, juntamente com

resíduos do alimento. Dessa forma, esse grupo de bactérias aderido se torna mais resistente à limpeza, desinfecção e remoção, podendo recontaminar o alimento processado. Os bioaerossóis, caracterizados por microrganismos suspensos no ar, representam outra rota de contaminação pós-processamento de alimentos.

A contaminação via aerossóis pode ser descrita usando-se a velocidade de deposição de partículas do ar sobre os alimentos. O nível dessa contaminação é dado por $CL=vNA t$, em que CL é o nível de contaminação (UFC); v é a velocidade de deposição (m/h); N é o número de células no ar (UFC·m⁻³ de ar); A é área de exposição do produto (m²) e t é o tempo de exposição deste ao ar. A contaminação pelo contato com manipuladores também é preocupante, dependendo do nível de contaminação e da probabilidade de transferência de microrganismos para o alimento (AANTREKKER et al., 2002).

Pela amostragem e análise do leite e de pontos do ambiente de processamento, o momento de entrada e contaminação do produto por esses microrganismos pode ser determinado. Dessa maneira, o próximo passo na identificação dos reservatórios desses organismos na indústria de laticínios envolve a compreensão da fonte de contaminação do leite *in natura* e do produto pronto. Ganhos importantes na qualidade e vida de prateleira dos produtos podem ser alcançados pela identificação da origem da microbiota deterioradora e pelo desenvolvimento de estratégias para sua eliminação (RALYEA et al., 1998).

Assim, diversos autores constataram que tanto o produtor quanto o consumidor seriam beneficiados com o controle da recontaminação por *B. cereus* no leite pasteurizado, tendo em vista que entre 10,0% e 65,0% das amostras do produto avaliadas em várias regiões do país encontram-se em desacordo com os padrões microbiológicos determinados pela legislação (SANTANA et al., 2001).

2.2. Higienização na indústria de laticínios e adesão bacteriana em superfícies de equipamentos

Os microrganismos patogênicos e deterioradores podem contaminar o leite em qualquer uma das etapas de produção, beneficiamento, distribuição e consumo. Práticas inadequadas de manejo, higienização deficiente de equipamentos em sala de ordenha, conservação inadequada e higienização deficiente de equipamentos de beneficiamento tornam o leite suscetível à contaminação (FRANCO et al., 2000).

A presença de microrganismos no ambiente de processamento dos alimentos pode levar à contaminação do produto acabado, reduzindo a sua qualidade. As fontes de contaminação do meio ambiente incluem o ar ambiente, água, alimentos, manipuladores, animais e insetos, além de equipamentos, utensílios e componentes estruturais da planta mal higienizados. As máquinas de envase de leite pasteurizado já foram confirmadas como importante fonte de contaminação desse alimento, contribuindo para sua deterioração e conseqüente diminuição da vida de prateleira (DOGAN; BOOR, 2003).

Vários métodos podem ser empregados para controlar do crescimento dos microrganismos psicrotróficos e prevenir ou reduzir a deterioração do leite e derivados (CHAMPAGNE et al., 1994). Entre eles destacam-se: i) resfriamento à temperatura até 4 °C; ii) emprego de práticas adequadas de higiene durante todo o processo de produção do leite e seus derivados; iii) emprego de calor/pasteurização quando a concentração de psicrotróficos ainda estiver baixa; iv) adição de bactérias lácticas no leite cru, sendo algumas capazes de produzir substâncias antimicrobianas, como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e antibióticos (bacteriocinas), que possuem importante papel no controle do crescimento dos microrganismos psicrotróficos; e v) incorporação de gases no leite, como N₂ e CO₂.

A bactofugação também é uma tecnologia muito usada, que visa reduzir a contaminação microbiológica do leite. Seu princípio consiste na remoção das bactérias e esporos por meio de diferença da densidade (1,2 g·mL⁻¹ para os microrganismos e 1,03 g·mL⁻¹ para o leite). O leite é separado do concentrado bacteriano ou bactofugado, que é descarregado

separadamente. A quantidade de bactofugado é de 2% a 3% do total do leite e contém entre 80% e 90% das células bacterianas presentes. O bactofugado é esterilizado, enquanto o leite é pasteurizado normalmente, sendo depois misturados (MORENO et al., 2002).

A limpeza e sanitização dos equipamentos e utensílios são, sem dúvida, operações fundamentais no controle sanitário na indústria de laticínios. Entretanto, freqüentemente são negligenciadas ou realizadas de forma inadequada. Além desses cuidados, somente o resfriamento e a aplicação de tratamento térmico, em tempo determinado, asseguram um efeito controlador sobre o crescimento microbiano no leite pasteurizado.

Nove pontos básicos fazem parte do plano PPHO: i) segurança da água; ii) condições e higiene das superfícies de contato com o alimento; iii) prevenção contra a contaminação cruzada; iv) higiene dos empregados; v) proteção contra contaminantes e adulterantes do alimento; vi) identificação e estocagem adequadas de substâncias químicas e agentes tóxicos; vii) saúde dos empregados; (viii) controle integrado de pragas; e ix) registros (MAPA, 2003).

O PPHO constitui, assim, uma extensão do Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos e visa reduzir ou eliminar riscos associados com a contaminação de leite e de produtos lácteos. São procedimentos descritos, desenvolvidos, implantados e monitorados, visando estabelecer a forma rotineira pela qual o estabelecimento industrial evitará contaminação direta ou cruzada e a adulteração do produto, preservando a sua qualidade e integridade por meio da higiene antes, durante e depois das operações industriais (BRASIL, 1997).

Quanto aos PPHO para os estabelecimentos de leite e derivados, segundo o DIPOA (MAPA, 2003), devem ser observados os seguintes itens: i) conservação e manutenção sanitária de instalações, equipamentos e utensílios; ii) freqüência (antes/durante/após operação industrial); iii) especificação e controle das substâncias detergentes e sanitizantes utilizadas e sua forma de uso; iv) formas de monitoramento e respectivas freqüências; v) aplicação de ações corretivas e eventuais desvios,

garantindo, inclusive, o apropriado destino dos produtos não conformes; vi) elaboração e manutenção do Plano de Implementação do PPHO, dos Formulários de Registros, dos documentos de monitorização e das ações corretivas adotadas, ressaltando-se que todos os documentos devem ser assinados e datados.

Uma higienização inadequada de superfícies na linha de produção em laticínios pode levar ao depósito de microrganismos e à sua aderência, com conseqüente formação de biofilmes.

O biofilme é a agregação de células microbianas que crescem e se multiplicam em uma superfície, sendo promovida por substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios microrganismos (FLINT et al., 1997).

Diversas teorias explicam a formação dos biofilmes, mas, basicamente, ocorre inicialmente o fluxo de nutrientes, matéria orgânica e inorgânica na superfície sólida, o que leva à formação de uma camada condicionante. Numa próxima etapa, acontecem a adesão dos microrganismos à superfície e o início do crescimento celular. Em seguida, há o aumento da atividade metabólica no biofilme, e, finalmente, as células começam a ser liberadas do biofilme, podendo originar características indesejáveis à qualidade do alimento processado (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

A adesão microbiana em superfícies é uma condição indispensável na formação de biofilmes, iniciando-se, dessa forma, com interações de longo alcance, fracas, não específicas entre células microbianas e a superfície. Essas ligações são instáveis, podendo as bactérias ser removidas por meio de um fluido. Entretanto, uma vez que as células se encontram muito próximas da superfície, formam interações de curto alcance e específicas, sendo o microrganismo aderido à superfície (CHEN; ZHU, 2005).

Propriedades físico-químicas das superfícies usadas na indústria de alimentos influenciam a adesão bacteriana, bem como as propriedades físico-químicas dos microrganismos (OLIVEIRA et al., 2003). Linhagens bacterianas com diferentes propriedades de superfície celular apresentaram diferentes cinéticas de adesão e afinidades por superfícies (BAKKER et al., 2002; CHEN; ZHU, 2005).

Em geral, a adesão bacteriana em superfícies pode ser relacionada aos aspectos termodinâmicos e às teorias DLVO (iniciais dos pesquisadores Derjaguim, Landau, Verway e Overbeek, que a desenvolveram) e DLVO Estendida (SHARMA; HANUMANTHA RAO, 2003), dentre as diferentes abordagens que têm sido utilizadas para descrever e, simultaneamente, prever a adesão.

Nessa abordagem dos aspectos termodinâmicos, segundo Sharma e Hanumantha Rao (2003), as energias livre de superfície, interfacial, de interação microrganismo e superfície são comparada antes e depois da adesão. A comparação é expressa em termos de energia livre de adesão, em que estão relacionadas a energia livre de Gibbs, a tensão superficial entre superfície e bactéria, a tensão superficial entre superfície e líquido e, por fim, a tensão superficial entre bactéria e líquido.

O cálculo das tensões superficiais é possível por meio da medida do ângulo de contato (Θ) entre superfície ou bactéria com líquidos-padrão com energia livre conhecida. Assim, como todo sistema na natureza, a interação microrganismo e superfície também procede em direção à diminuição de energia livre de Gibbs, e a adesão microbiana ocorrerá se a energia for negativa e a adesão será termodinamicamente desfavorável, se positiva (SHARMA; HANUMANTHA RAO, 2003).

O ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida (Figura 1) é o ângulo entre um plano tangente a uma gota e a superfície onde o líquido se encontra depositado. Segundo van Oss e Giese (1995), as medidas do ângulo de contato com uma gota de um líquido sobre uma superfície indicam que esta última é hidrofílica, se forem inferiores a 50°. Ângulos superiores a esse valor indicam uma superfície hidrofóbica. No entanto, para Vogler (1998), uma superfície hidrofóbica deve apresentar ângulo de contato com a água superior a 65°.

Esse ângulo, portanto, permite avaliar a molhabilidade das superfícies. Sua medida é realizada com a utilização de um líquido apolar e dois polares, e, se o líquido for a água, o ângulo formado será relacionado à hidrofobicidade da superfície.



Figura 1 – Ângulo de contato (θ) entre uma gota e uma superfície plana e horizontal. As tensões superficiais da superfície do sólido, do líquido em equilíbrio com o vapor e superfície e líquido, respectivamente, γ_s , γ_{LV} e γ_{SL} .

Uma relação entre o ângulo de contato formado pelo líquido sobre uma superfície sólida e os componentes da tensão superficial do líquido e da superfície pode ser feita pela equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes:

$$(1 - \cos \theta)\gamma_l = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^-\gamma_l^+}) \quad (\text{n}^\circ 1) \quad (\text{OLIVEIRA, 2006}).$$

Para líquidos apolares, a componente polar da tensão superficial é nula, e, portanto, a equação anterior se reduz à equação:

$$\gamma_s^{LW} = \frac{\gamma_l^{TOT}}{4}(1 + \cos \theta)^2 \quad (\text{n}^\circ 2), \text{ sendo } \gamma_l^{TOT} \text{ a tensão superficial total do líquido;}$$

γ_s^{LW} , a tensão superficial das forças de interação ácido-base de Lewis; γ_l^+ , a tensão superficial do componente aceptor de elétrons do componente ácido-base; e γ_l^- , a tensão superficial do componente doador de elétrons do

Tabela 1 – Componentes da tensão superficial de líquidos a 25 °C

Líquido	Tensão Superficial (mJ.m ⁻²)			
	Y _l ^{Tot}	Y _l ^{LW}	Y _l ⁺	Y _l ⁻
Di-iodometano	50,8	50,8	0,0	0,0
α-Bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Glicerol	64,0	34,0	3,92	57,4
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6
Decano	23,8	23,8	0,0	0,0

Y_l^{Tot}: tensão superficial total do líquido; Y_l^{LW}: tensão superficial das forças de interação ácido-base de Lewis; Y_l⁺: tensão superficial do componente acceptor de elétrons do componente ácido-base; e Y_l⁻: tensão superficial do componente doador de elétrons do componente ácido-base.

Quando, no entanto, uma partícula ou microrganismo está muito próximo de uma superfície (2-5 nm), forças de curto alcance passam a regular o processo de adesão, denominadas forças “não DVLO”, representadas pelas forças de repulsão de Born, forças de hidratação, as interações hidrofóbicas e pontes poliméricas. A teoria DLVO Estendida, que complementou a teoria DVLO, adiciona à teoria antiga forças ácido-base de Lewis, para considerar os aspectos relacionados aos microrganismos no processo de adesão. Assim, a energia livre das interações totais (energia livre de Gibbs) numa superfície é resultante do somatório das energias livres das interações de Lifshitz-van der Waals, interações ácido-base de Lewis e forças eletrostáticas de dupla camada elétrica (OLIVEIRA, 2006; SHARMA; HANUMANTHA RAO, 2003).

A equação da energia livre das interações totais numa superfície, de número 3, é a seguinte: $\Delta G^{TOT} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{EL}$, sendo (ΔG^{TOT}) a energia livre das interações totais numa superfície, (ΔG^{LW}) energia livre das interações de Lifshitz-van der Waals, (ΔG^{AB}) energia livre das interações ácido-base de Lewis e (ΔG^{EL}) forças eletrostáticas de dupla camada elétrica.

A intensidade das forças de Lifshitz-van der Waals é diretamente proporcional ao tamanho das partículas que se interagem e na razão inversa da distância à superfície. As forças de dupla-camada elétrica estão relacionadas à carga elétrica superficial e aos movimentos brownianos. A superfície de um sólido eletricamente carregado, em contato com uma solução aquosa, atrai íons de sinal contrário ao meio e, simultaneamente, repele os de sinais iguais. Uma vez que a maioria das superfícies adquire carga negativa em solução, as forças da dupla camada elétrica apresentam, geralmente, um caráter repulsivo. Dessa maneira, a adesão somente será irreversível quando a energia livre de Gibbs total for negativa e a distância entre a superfície e o microrganismo for a mínima possível.

Quando aderidas, as células microbianas podem sobreviver mais facilmente em condições adversas. Os procedimentos mais comuns de controle da adesão e da formação de biofilmes indesejáveis englobam a aplicação de agentes antimicrobianos. Entretanto, esses procedimentos de desinfecção demonstram, freqüentemente, alguma ineficiência na inativação e eliminação de biofilmes (COSTERTON et al., 1987).

A presença de *B. cereus* nas superfícies de equipamentos, principalmente em aço inoxidável, é muito comum. Essa bactéria é tida como um microrganismo que possui grande capacidade de aderir a superfícies de aço inoxidável em usinas de leite, sendo um obstáculo para a conservação do leite pasteurizado, como já mencionado (PENG et al., 2002).

Para Kotiranta et al. (2000), os esporos de *B. cereus* são muito aderentes a diferentes superfícies, mais aderentes que células vegetativas, o que leva a maior dificuldade no controle desse microrganismo. Entretanto, esporos aderidos são mais facilmente removidos, em comparação com células bacterianas aderidas.

A aderência dessa bactéria está relacionada a três características principais: morfologia celular e do esporo, hidrofobicidade e baixa carga de superfície dos seus esporos, os quais são cobertos com apêndices que promovem a adesão (ANDERSSON et al., 1995).

Nos últimos anos, muito tem sido discutida a diversidade de espécies e sua distribuição espacial em biofilmes, sendo o desafio para o futuro entender a expressão genética sobre propriedades fisiológicas e a interação

entre células no biofilme. Alguns fatores relacionados com o potencial morfológico e fisiológico de uma espécie microbiana podem influenciar a adesão e a conseqüente formação de biofilmes nas superfícies de equipamentos na indústria de alimentos.

Em primeiro lugar, os apêndices celulares podem servir de ligação entre a célula e o substrato de adesão, anulando a repulsão eletrostática, enquanto a bactéria não faz contato direto com a superfície (DENYER et al., 1993). Estruturas como *pili*, fímbria, exopolissacarídeos e proteínas de parede celular podem variar em tamanho e rigidez, chegando a ter várias vezes a dimensão da célula. Vários componentes de superfície celular têm sido reconhecidos como sensores moleculares, atuando estereoquimicamente com moléculas de superfície, chamadas de adesinas. Os apêndices contribuem para a hidrofobicidade, carga superficial e energia livre de superfície (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987).

A natureza dos organismos constituintes do biofilme e a disponibilidade de nutrientes também são fatores que podem afetar sua formação e estrutura. Dessa maneira, os biofilmes podem apresentar-se em estruturas finas ou grossas. Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, em que o fluxo de nutrientes foi constante, colonizaram a superfície de maneira a obter uma forma semelhante a cogumelos, em que canais de água interligavam as microcolônias, como um primitivo sistema circulatório, distribuindo nutrientes e removendo resíduos das microcolônias (STICKLER, 1999).

Ainda, o pH e a temperatura da superfície de contato influenciam o grau de adesão do microrganismo. Em estudos realizados por Stone e Zottola (1985), constatou-se que, na adesão em aço inoxidável em fluxo contínuo de leite, *Pseudomonas fragi* produziu fímbria em 30 minutos a 25 °C e dentro de duas horas a 4 °C. A adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em aço inoxidável foi maior em pH ótimo para o metabolismo da célula, e presume-se que essa adesão ocorreu em razão do transporte ativo de cátions para a superfície, aumentando sua carga superficial (ZOTTOLA, 1994).

As propriedades das superfícies mais importantes para o processo de adesão de microrganismos são a hidrofobicidade, carga elétrica e

rugosidade. O aço inoxidável é o material escolhido para superfícies de trabalho na maioria das indústrias de alimentos, devido a diversas propriedades como força mecânica, resistência a corrosão e durabilidade. O acabamento ou o polimento do aço inoxidável são, ainda, características importantes desse material para seu emprego em equipamentos na área de produção de alimentos. Normalmente, na indústria de alimentos é utilizado o aço inoxidável com polimento 4, numa escala que varia de 0 (sem polimento) até 8, cuja superfície é espelhada (HAYES, 1993).

Interações hidrofóbicas têm papel relevante na aderência de organismos patogênicos e não-patogênicos em tecidos vivos, e, assim, mecanismos similares podem ser responsáveis pela adesão em substratos inanimados. Essas interações são induzidas por moléculas de água situadas no meio de solutos não-polares (DENYER et al., 1993).

Em geral, as bactérias Gram-negativas e as Gram-positivas apresentam carga elétrica negativa em pH neutro. Embora os mecanismos não sejam completamente entendidos, esses fatores físico-químicos têm importante papel no processo de adesão microbiana (HOOD; ZOTTOLA, 1995).

Pode-se dizer que tanto a bactéria quanto o substrato adquirem carga, que geralmente é negativa, em virtude da adsorção de íons ou de ionização de grupos de superfície, podendo, então, atrair íons contrários que estão na fase aquosa circundante. Assim, quando a bactéria aproxima-se da superfície do substrato, ocorre o início do desenvolvimento de interações resultantes da atmosfera iônica, que circunda as duas superfícies. A intensidade dessa força depende do potencial das duas superfícies, da força iônica e constante dielétrica do meio circundante e depende, ainda, da distância entre a bactéria e o substrato (DENYER et al., 1993).

No último estágio de adesão da célula microbiana à superfície, na adesão irreversível ocorre a produção de exopolissacarídeos e envolve interações específicas. Ainda segundo Denyer et al. (1993), essas substâncias poliméricas extracelulares influenciam a adesão, a difusividade, a condutividade térmica nos biofilmes e as propriedades reológicas. Podem ser mais ou menos espessas/viscosas, dependendo do estado fisiológico do microrganismo que as produzem.

A cápsula de muitas bactérias é composta por polissacarídeos, embora algumas espécies do gênero *Bacillus* possam formar cápsula de polipeptídeo. A presença de cápsula pode aumentar a adesão microbiana e atuar como defesa contra a fagocitose. Esse material pode, também, facilitar a adsorção de agentes tóxicos, prevenindo, assim, sua penetração no citoplasma. *B. cereus* apresenta notável resistência e capacidade para sobreviver a tratamentos de descontaminação, o que torna difícil seu controle, especialmente em ambientes de processamento de alimentos (PENG et al., 2001).

Jullien et al. (2002) chegaram a relatar números de aproximadamente 1.000 esporos de *B. cereus* por cm², aderidos ao aço inoxidável, após completo procedimento de higienização em equipamentos de laticínios.

Torna-se, então, mais vantajosa a prevenção da adesão bacteriana em superfícies da indústria de laticínios. Pela aplicação de procedimentos de higienização adequados e seu monitoramento, é possível a redução na perda de produtos por deterioração microbiana, garantindo as especificações de qualidade destes (WIRTANEN et al., 1996; FORSYTHE, 2002).

A meta do controle microbiano no processamento de alimentos possui, dessa forma, duas vertentes: i) reduzir ou eliminar o número de bactérias e sua atividade e ii) prevenir e controlar a formação de depósitos nas superfícies de equipamentos. Atualmente, as formas mais eficientes de limitar o crescimento microbiano são a boa higiene durante a produção, o processamento racional na linha de produção e o uso correto de detergentes e agentes químicos durante a higienização (MAUKONEN et al., 2003).

A chave para esse controle e uma higienização eficaz estão, portanto, no entendimento e observação do tipo e natureza do substrato que entra em contato com as superfícies de processamento, bem como dos microrganismos mais importantes para cada situação, que devem ser removidos (TROLLER, 1993).

No mais, a seleção de detergentes e sanitizantes na indústria de laticínios deve observar a sua eficácia e segurança, bem como suas propriedades de corrosão, de capacidade de molhagem e penetração, de facilidade de enxágüe e de presença de resíduos no alimento, entre outras.

Um programa de higienização efetivo, ou seja, que remova material indesejável das superfícies, incluindo microrganismos, substratos, corpos estranhos e resíduos de agentes químicos, envolve alguns estágios: a molhagem da superfície e da sujidade pelos agentes de limpeza, a reação dos agentes detergentes para facilitar a remoção da matéria orgânica e inorgânica da superfície, a prevenção da redeposição e a eliminação dos microrganismos residuais pelos agentes sanitizantes (GIBSON et al., 1999).

Procedimentos CIP (*Cleaning-in-place*), muito usados em indústrias de laticínios, possuem certas limitações, podendo levar ao acúmulo de microrganismos nas superfícies do equipamento, resultando na formação de biofilmes. O monitoramento do desenvolvimento desses biofilmes nas tubulações deve ser parte do plano APPCC (SHARMA; ANAND, 2002).

Segundo Maukonen et al. (2003), o uso de temperaturas elevadas nos procedimentos de higienização pode reduzir o uso da força física, tendo sua importância justificada em procedimentos CIP. Ainda segundo esses mesmos autores, freqüentemente os agentes químicos sanitizantes são utilizados em combinação com detergentes alcalinos, para suspender e dissolver resíduos de alimento, pela diminuição da tensão superficial, emulsão de gorduras e desnaturação de proteínas, o que é necessário em muitas situações na indústria de laticínios.

De acordo com Chmielewski e Frank (2003), a ação mecânica ou a turbulência possui papel importante na eliminação de biofilmes na limpeza CIP. Um procedimento efetivo de higienização, nesse caso, precisa solubilizar ou dissolver a matriz de exopolissacarídeo do biofilme, para que o agente sanitizante possa ter acesso às células viáveis.

Sugere-se que as soluções de higienização sejam circuladas a, pelo menos, $1,5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Em velocidade mais baixa, a higienização pode tornar-se deficiente durante a limpeza do equipamento, e erros dessa natureza permitem que grande número de bactérias permaneça aderido à superfície de equipamentos na indústria de laticínios (FIGUEIREDO, 2000).

A etapa de limpeza ou apenas o uso de detergentes pode eliminar 90% dos microrganismos da superfície em questão, mas, segundo Gibson et al. (1999), a etapa de sanitização não deixa de ser importante. Os

microrganismos precisam ser inativados, pois têm a capacidade de se redepositarem em outros pontos e formar novos biofilmes.

Os dados da literatura permitem destacar a grande importância da higienização para a indústria de laticínios, na obtenção de produtos de qualidade. Entretanto, para atingir essa meta, o sistema de limpeza e sanitização deve incluir seqüências específicas de agentes de limpeza e sanitização, aplicados de forma sistemática, com combinações determinadas de tempo e temperatura, após o uso dos equipamentos.

2.3. Identificação e rastreamento de *Bacillus cereus* em laticínios

B. cereus em alimentos pode ser determinado pelo método de contagem direta em placas ou pelo método de número mais provável (NMP), recomendado quando se esperam contagens abaixo de 10 células por grama do produto. O Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP) é o meio mais utilizado na contagem direta em placas. Esse meio usa o sulfato de polimixina B como agente seletivo, enquanto a gema de ovo e o manitol são constituintes de diferenciação. Colônias de *B. cereus* são manitol-negativas e apresentam-se usualmente róseas. A reação de produção de lecitinase evidencia-se pelo halo denso e opaco de precipitação de lecitina (MILAGRES, 2004).

Bacillus cereus é uma bactéria patogênica e importante na deterioração de produtos lácteos. No entanto, *Bacillus thuringiensis* é geralmente considerado patogênico para o homem e produz uma toxina letal para determinados insetos, sendo utilizado como pesticida biológico. *Bacillus mycoides* não é reconhecido como patogênico, e, finalmente, *Bacillus anthracis* é o causador de doença letal (antraz) e tem sido usado como arma biológica por agentes terroristas (MAZANO et al., 2003).

Os testes para confirmação de *Bacillus cereus* e de outros membros do grupo (*Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus anthracis*) são baseados em técnicas bioquímicas e testes morfológicos, cuja validade tem sido confirmada em estudos feitos por laboratórios de referência (MILAGRES, 2004).

Metodologias microbiológicas tradicionais para o rastreamento e identificação desses microrganismos podem, no entanto, levar vários dias para a obtenção de resultados. As análises convencionais nem sempre suprem as necessidades da indústria, que necessita de uma identificação rápida da fonte de contaminação para a tomada de decisão no seu programa de controle de qualidade (BRUCE, 1996).

O rastreamento de reservatórios desses microrganismos contaminantes, no ambiente de processamento, requer a capacidade de diferenciar sensivelmente cepas bacterianas, com maior agilidade. Assim, a identificação do mesmo gene e cepa, por meio de técnicas moleculares em ambos, ambiente de processamento e produto pronto, pode estabelecer uma relação causal direta (RALYEA et al., 1998).

No início da década de 1980, uma variedade de técnicas moleculares foi desenvolvida em laboratórios de pesquisa para análises do DNA e exploração genética. Algumas dessas tecnologias foram aplicadas a análises bacteriológicas, como a ribotipagem. Esta é um método para geração de impressões genéticas bacterianas (*fingerprints*), baseado no polimorfismo dos genes rDNA (BRUCE, 1996).

A combinação das tecnologias da reação em cadeia da DNA polimerase ("*polymerase chain reaction*"-PCR) com as de seqüenciamento de ácidos nucléicos permite o isolamento e identificação de ampla gama de bactérias, incluindo aquelas para as quais métodos de isolamento e cultivo em meios de laboratório ainda não foram desenvolvidos (RALYEA et al., 1998).

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) proporciona a amplificação de um segmento de DNA, delimitado por dois iniciadores (ou *primers*), comumente com 10 pares de bases, que são complementares a dois sítios de nucleotídeos, um em cada fita do DNA. Os produtos resultantes da amplificação podem ser visualizados como bandas em géis de agarose ou poliacrilamida. Diferenças nível de DNA são inferidas pela presença ou ausência de determinado fragmento amplificado (banda no gel). Para amplificar, o *primer* (ou iniciador) utilizado, que é um oligonucleotídeo de aproximadamente 10 nucleotídeos, precisa-se anelar com seqüências complementares e invertidas com relação às fitas, que foram previamente

separadas por aumento da temperatura (92 °C – 94 °C). O anelamento entre os *primers* e as seqüências complementares é efetuado a uma temperatura de 35 °C a 50 °C. Uma *Taq* DNA polimerase estende (ou sintetiza) as cadeias originadas pelos *primers*, cuja temperatura ótima de catálise é de 72 °C.

Existem equipamentos programáveis de PCR, os termocicladores, capazes de modificar a temperatura rapidamente. Na realidade, cada ciclo da PCR é composto de três etapas: a separação das fitas (92 °C – 94 °C), o anelamento dos *primers* com o DNA (35 a 50 °C) e a extensão ou polimerização da cadeia (72 °C). A rigor, uma vez atingidas as temperaturas de cada fase são necessários poucos segundos para que a reação ocorra. E os termocicladores têm a capacidade de alterar a temperatura de forma rápida e repetir o ciclo tantas vezes quantas forem ordenadas. O número de fragmentos amplificados duplica a cada ciclo. Sucessivos ciclos produzem milhões de fragmentos virtualmente idênticos, em apenas algumas horas. Os produtos da PCR podem ser facilmente visualizados num gel de agarose, com o auxílio do brometo de etila, que, quando presente no gel, se interpõe entre as duas fitas do DNA e se torna avermelhado com a absorção da luz ultravioleta (WALKER, 2002).

Outra metodologia molecular importante é a análise de restrição. Se o DNA de isolados, diferindo num ou vários nucleotídeos, forem expostos às enzimas de restrição, fragmentos de diferentes tamanhos, portanto polimórficos, são gerados e podem ser identificados e clonados. Tais fragmentos são denominados RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, fragmentos polimórficos de DNA) e foram desenvolvidos por Botstein et al. (1980). Os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição ou polimorfismo de tamanho de fragmento são sítios no DNA que podem ser identificados e mapeados (BRUCE et al., 1957).

A obtenção de RFLPs envolve várias etapas. Em primeiro lugar é preciso extrair e purificar o DNA. Em seguida, esse DNA deve ser digerido (cortado) por enzimas de restrição, que são capazes de reconhecer pequena seqüência de pares de bases (pb) e, então, cortar o DNA nesse sítio de reconhecimento ou clivagem. A terceira etapa do processo consiste em

separar essa mistura de fragmentos de diferentes comprimentos pela eletroforese em gel de agarose. A migração dos fragmentos de DNA num gel é dependente do seu tamanho, migrando mais rapidamente os menores (BRUCE et al., 1997).

Subseqüentemente, os fragmentos de DNA, na condição de fita simples (após tratamento com hidróxido de sódio), são transferidos para uma membrana de náilon ou celulose carregada positivamente, técnica que é denominada *Southern blot* e proporciona suporte sólido para o DNA, que passa a ser imobilizado nesse suporte. Então, é possível analisar individualmente cada um dos fragmentos. A próxima etapa do RFLP é a hibridização do DNA já imobilizado, em membranas com uma sonda (ou *probe*) radioativa de DNA complementar ao fragmento de interesse. Para que haja hibridização, há a necessidade de que pelo menos parte da sonda seja complementar ao fragmento de interesse. Existe uma alternativa de marcação de sondas que não a radioativa. A última etapa, a auto-radiografia, consiste na exposição da membrana hibridizada com a sonda radioativa a um filme de raios X, que é queimado somente onde ocorrem as hibridizações. A sonda, sendo radioativa, emite radiação que pode ser detectada por filmes de raios X, já que a sonda só hibridiza com fragmentos complementares e a precisão é alta. Assim, a associação enzima de restrição e sonda identifica um loco RFLP, que caracteriza o isolado. Admitindo que duas cepas diferem em um sítio de reconhecimento, então elas apresentarão fragmentos de diferentes comprimentos, com relação a uma sonda complementar. Tais fragmentos se localizam em diferentes posições na membrana. Conseqüentemente, apresentarão bandas ocupando diferentes posições no filme e indicarão a existência de polimorfismo em nível de DNA, sendo essas cepas caracterizadas em perfis diferentes (BRUCE et al., 1997).

O método de ribotipagem baseia-se na existência de seqüências altamente conservadas no RNA da subunidade menor dos ribossomos (RNAr 16S) de todas as bactérias e seqüências intersticiais variáveis nessas moléculas, que são espécies-específicas. A molécula de RNAr 16S é encontrada em todas as bactérias e tornou-se padrão universal para a identificação e classificação de bactérias. A amplificação, pelo PCR, de

seqüências de DNA complementares a seqüências variáveis do RNAr 16S de um microrganismo desconhecido e a sua comparação com seqüências variáveis do RNAr 16S de espécies conhecidas fornecem informação suficiente para identificá-lo como membro de uma espécie ou grupo conhecido ou para colocá-lo em uma nova espécie (BRUCE et al., 1997).

Um sistema desenvolvido pela *Qualicon/Du Pont Company* combina vários passos de análise molecular em instrumento automático de ribotipagem, desenvolvido para satisfazer as necessidades da indústria de alimentos. Trabalhando a partir de uma colônia bacteriana isolada, o sistema processa todas as etapas necessárias para a caracterização da cepa em questão. Quando fragmentos de DNA de diferentes cepas, cortados com a enzima de restrição *Eco RI*, são separados de acordo com suas dimensões e hibridizados com seqüências marcadas de DNA, cada cepa produz um único fragmento-padrão. A partir desse fragmento-padrão, o sistema utiliza uma série de informações para gerar um padrão de ribotipo ou um perfil. Posteriormente, o sistema caracteriza, arquiva e compara esse padrão com um banco de dados próprio. O sistema baseia-se em um exame densitométrico, analisando-se a distribuição dos fragmentos de DNA formados e seus pesos moleculares. O resultado final fornece informação suficiente para estabelecer relações entre os contaminantes microbianos dos produtos finais e seus reservatórios (RALYEA et al., 1998).

Devido à importância da precisão e do tempo na caracterização, identificação e eventual eliminação de microrganismos indesejáveis para a indústria de alimentos, esse sistema automatizado foi desenvolvido para reduzir o tempo envolvido em cada etapa de análise, sendo necessárias apenas oito horas para a obtenção de resultados precisos e confiáveis (BRUCE, 1996).

O funcionamento do *Sistema RiboPrinter®* inicia-se com amostras de culturas puras, que são adicionadas ao módulo de processamento. Relações entre os padrões gerados e aqueles já armazenados podem, então, ser analisadas, assim como podem também ser encontradas identidades bacterianas (BRUCE, 1996).

Boor tem mostrado que os microrganismos deterioradores, isolados após o processamento de leite pasteurizado, são, em sua maioria, *Bacillus*

spp, que freqüentemente afetam a extensão da vida útil do produto (BOOR, 2003). Pesquisadores acreditam que a contaminação do leite pasteurizado por *Bacillus* spp resulta da sobrevivência de esporos que estariam presentes no leite *in natura*. Entretanto, outros dados da literatura indicam que a contaminação pós-processamento contribui, de forma relevante, para aumentar as contagens microbianas no produto (SCHRAFT et al., 1996).

O *Sistema RiboPrinter®* da *DuPont Qualicon Company* permite realizar a rastreabilidade completa do microrganismo em questão, identificando a fonte e causa da contaminação de maneira direta e indubitável, pois fornece um perfil genético de cada uma das bactérias implicadas, permitindo que as bactérias com o ribogruppo coincidente sejam identificadas e a causa do problema, prevenida e, ou, eliminada (VERUS MADASA, 2007).

Recentemente, segundo a DuPont Brasil (2006), o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) adquiriu o *Sistema RiboPrinter®* para a criação de um banco de dados de microrganismos identificados no país, de forma regionalizada, o que possibilitará a compreensão de quais patógenos e quais alimentos estão afetando a saúde da população brasileira. O *Riboprinter®* também será uma ferramenta auxiliar no Plano Nacional de Redução de Microrganismos Patogênicos nas indústrias de carnes e aves. O sistema patentado *RiboPrinter®* é o único instrumento automatizado de impressão digital por DNA que indica, com rapidez e precisão, as fontes bacterianas. Além de caracterizar bactérias abaixo do nível da espécie, os produtores e processadores de alimentos contam, agora, com a possibilidade de rastrear grupos de micróbios agressores e reconhecer tendências no meio ambiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido em uma usina de beneficiamento de leite de pequeno porte (10.000 litros de leite/dia) da Zona da Mata de Minas Gerais, utilizada como modelo para a análise abrangente de fontes de microrganismos deterioradores, particularmente de *Bacillus cereus*, nos sistemas de processamento de leite.

As análises de identificação microbiana e do estudo dos métodos de higienização foram desenvolvidas no Laboratório de Higiene de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Os isolados de *B. cereus* foram submetidos à ribotipagem no Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em São Paulo, SP.

Finalmente, o estudo da carga elétrica relativa da superfície microbiana foi desenvolvido no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

3.1. Análise da contaminação por *Bacillus cereus* em leite e em superfícies de equipamentos na indústria de laticínios

Com a finalidade de verificar a prevalência de *B. cereus* no leite pasteurizado e nas superfícies de equipamentos na linha de produção após

a higienização, foram coletadas amostras de leite pasteurizado padronizado e de superfícies em cinco pontos diferentes na linha de produção.

Quatro unidades de leite pasteurizado padronizado, à temperatura de refrigeração (± 8 °C), em embalagem de polietileno de baixa densidade (PEDB), foram coletadas semanalmente, durante nove semanas, sendo transportadas para o laboratório, para análise imediata quanto à presença de *B. cereus*.

Na Tabela 2 estão relacionadas as superfícies da linha de produção de leite pasteurizado tipo C, amostradas pela técnica do *swab*, proposta por Evancho et al. (2001), com modificações para superfícies não-planas, e as respectivas áreas amostradas, para posterior determinação de *B. cereus*.

Tabela 2 – Superfícies amostradas pela técnica do *swab* na linha de produção de leite pasteurizado tipo C e respectivas áreas amostradas

Superfície Amostrada	Área Amostrada (cm ²)
*Rosca da tubulação da máquina de envase (RT)	42
Tanque de equilíbrio da máquina de envase (TEM)	50
*Tubo formador da embalagem (TFE)	81
*Tubo de envase (TE)	16
Tanque de armazenamento de leite pasteurizado (TLP)	50

* Superfícies não-planas – técnica de *swab*, com modificações.

Para as superfícies não-planas amostradas, a técnica do *swab* recebeu algumas modificações: i) toda a área ou superfície descrita foi amostrada; ii) o *swab* foi passado em todas as rugosidades e reentrâncias das roscas das tubulações, em três repetições; e iii) no tubo que enrola a embalagem, o *swab* foi passado em toda a área de contato com a embalagem, inclusive na adjacência embalagem-tubo, em três repetições.

A Figura 2 ilustra os locais a partir dos quais foram tomadas amostras de superfícies para avaliação, neste estudo, na planta de laticínios de pequeno porte.

As coletas por *swab* também foram realizadas durante um período de nove semanas, de forma não simultânea, com a coleta das amostras de leite logo após a realização dos procedimentos de higienização dos equipamentos (Tabela 3), segundo descrição dos funcionários responsáveis.

Alíquotas de 0,1 mL de cada unidade amostrada de leite pasteurizado foram inoculadas na superfície de ágar MYP (*Agar Mannitol Yolk Polymyxin B/MERCK*), seletivo para *B. cereus*, para contagem e isolamento desse microrganismo. Ainda, alíquotas das diluições decimais das amostras de *swab* foram inoculadas na superfície de ágar MYP. O número de células do grupo *B. cereus* aderidas às superfícies dos equipamentos e presentes no leite pasteurizado foi expresso em UFC.cm⁻².

De cada placa de MYP, três colônias características, que apresentaram atividade de lecitinase e não fermentaram manitol, foram submetidas a provas bioquímicas e morfotinturiais (coloração de Gram, teste de motilidade, teste de crescimento rizóide, teste de decomposição de tirosina, teste de fermentação anaeróbia de glicose, teste de Voges-Proskauer e teste de redução de nitrato), segundo a APHA (2001), e foram repicadas para caldo BHI (Brain Heart Infusion) e, então, submetidas à confirmação bioquímica.

As amostras confirmadas de *B. cereus* foram submetidas à ribotipagem na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).



Figura 2 – Fotografias de parte dos equipamentos amostrados: rosca da tubulação da máquina de envase (a), tanque de equilíbrio da máquina de envase (b), tubo formador da embalagem (c), tubo de envase (d) e tanque de leite pasteurizado (e).

Tabela 3 – Procedimento operacional padrão utilizado para procedimentos CIP e para a máquina de envase na indústria de laticínios estudada

Procedimento Operacional Padrão de Higienização (CIP)	
(Tanque de armazenamento de leite pasteurizado, rosca da tubulação da máquina de envase)	
i)	Pré-lavagem com água à temperatura ambiente
ii)	Lavagem com 1% de alcalinidade cáustica, preparada a partir de hidróxido de sódio comercial, pH 13, à temperatura ambiente
iii)	Enxágüe com água morna;
iv)	Lavagem com solução 1% de acidez total, preparada a partir de HNO ₃ , de pH 1,5, à temperatura de 25 °C, com frequência semanal
v)	Enxágüe com água morna
vi)	Sanitização com 100 mg.L ⁻¹ de cloro residual total (CRT), preparado a partir de dicloroisocianurato de sódio, com pH entre 7,0 e 7,5, a 25 °C
Procedimento Manual para Máquina de Envase	
(Tubo formador da embalagem, tanque de equilíbrio da máquina de envase e bico formador da embalagem)	
i)	Pré-lavagem com água à temperatura ambiente
ii)	Desmonte da máquina, registros e borrachas, entre outros
iii)	Lavagem com detergente alcalino para limpeza geral (Pluron 485 A), diluição de 200 mg·10 L ⁻¹ de água, e esponja fibraço da 3M, à temperatura ambiente
iv)	Enxágüe com água morna
v)	Montagem das peças e aplicação por aspersão de água quente (60 °C)
vi)	Enxaguagem com água fria
vii)	Sanitização com 180 mg.L ⁻¹ de cloro residual total (CRT), preparado a partir de dicloroisocianurato de sódio, pH entre 7,0 e 7,5, a 25 °C. Solução em contato até o outro dia, com tempo de exposição de aproximadamente 12 horas

3.2. Ribotipagem de *Bacillus cereus* isolados de superfícies pós-pasteurização do leite e do leite pasteurizado e determinação da carga elétrica superficial dos ribogrupos

3.2.1. Ribotipagem dos isolados de *Bacillus cereus*

Para identificação definitiva e rastreamento dos reservatórios de *Bacillus cereus* na linha de produção de leite pasteurizado, um subconjunto de isolados coletados e confirmados bioquimicamente foi submetido à ribotipagem automática. Isolados oriundos do leite pasteurizado e dos cinco pontos avaliados nas superfícies dos equipamentos foram analisados pelo Sistema RiboPrinter® da DuPont Qualicon Company (Figura 3), a fim de agrupá-los segundo suas “impressões genéticas” (*fingerprints*), permitindo uma relação de “causa e efeito”.

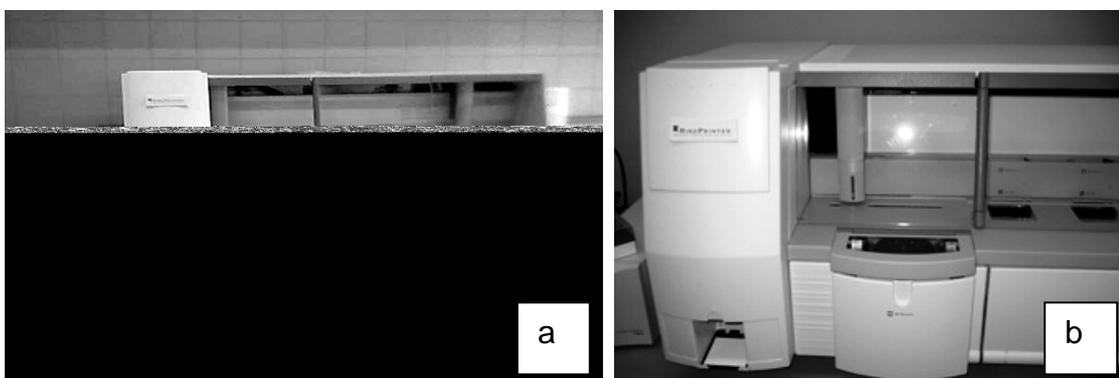


Figura 3 – Sistema RiboPrinter® da DuPont Qualicon Company, do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Universidade Federal de São Paulo, SP.

Foram utilizadas culturas *overnight*, no processo automatizado de ribotipagem, que incluiu o preparo da amostra (Figura 4); o processo de eletroforese; *blotting*; hibridização; e a análise dos dados automatizados.



Figura 4 – Culturas *overnight* e preparo das amostras para a ribotipagem automatizada no *Sistema RiboPrinter®*.

Um *kit* de análise da *Verus Madasa*, específico para o *Sistema RiboPrinter®*, contendo os tampões, os *primers* e os oligonucleotídeos necessários, além da enzima de restrição *Eco RI*, foi utilizado para o procedimento da ribotipagem (Figura 5).

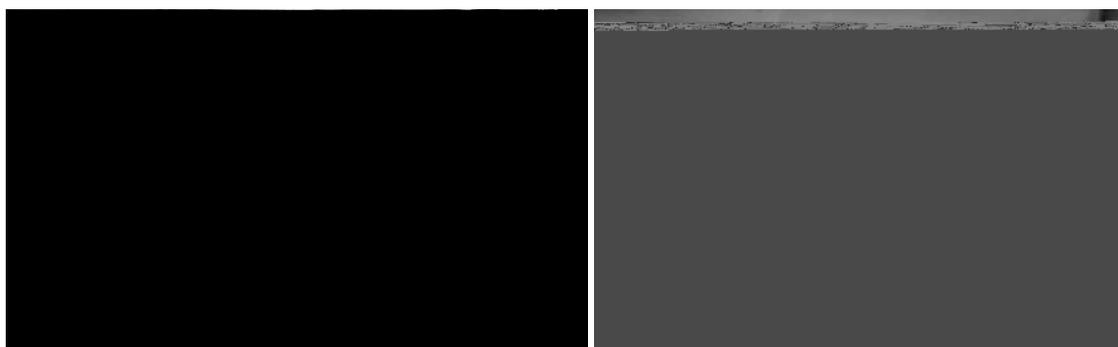


Figura 5 – a) *Kit* de análise da *Verus Madasa*, específico para o *Sistema RiboPrinter®*; e b) *Kit* inserido no equipamento de ribotipagem.

Depois de preparadas, as amostras foram inseridas no equipamento para a realização da análise (Figura 6), após a checagem do Sistema, com a reposição de água destilada e programação.

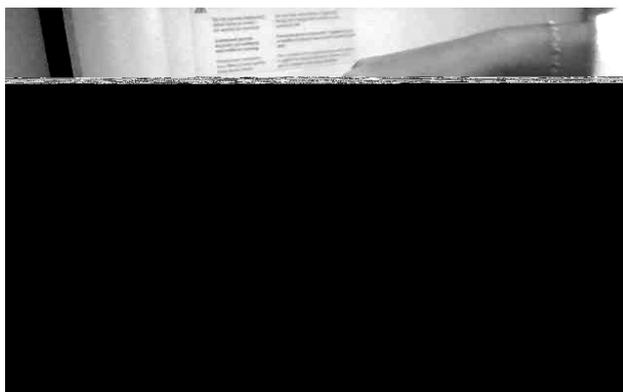
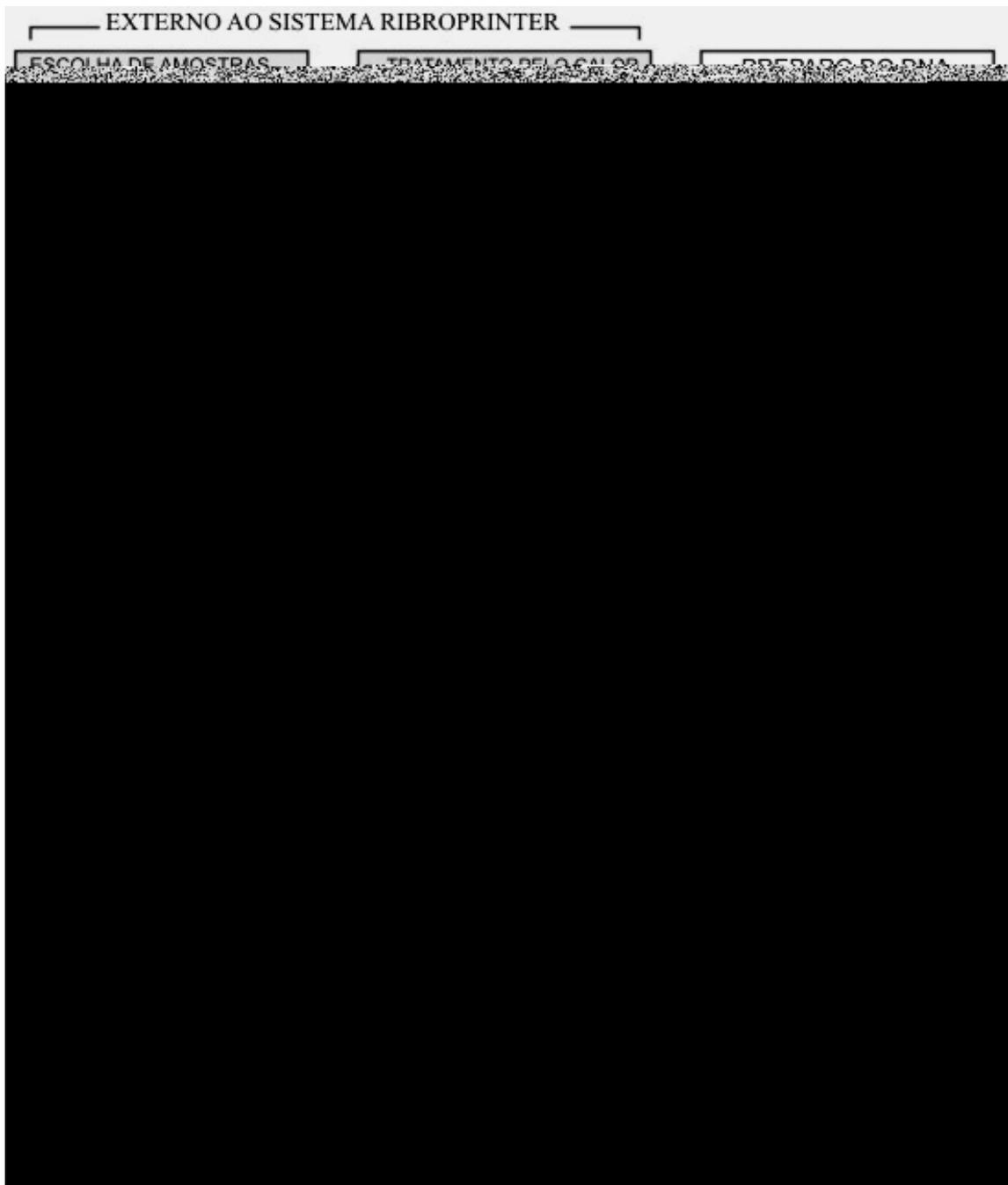


Figura 6 – Inserção das amostras de isolados de *Bacillus cereus*, previamente preparadas, no *Sistema RiboPrinter®*.

O equipamento processou oito por vez, seguindo-se etapas de funcionamento automático, como apresentado na Figura 7: após o preparo das amostras, o processo começa com a lise celular e com a quebra do DNA em fragmentos pela enzima de restrição; esses fragmentos são separados por eletroforese em gel, segundo seu tamanho, e, em seguida, transferidos para uma membrana, onde são hibridizados com a prova de DNA e misturados com o agente quimioluminescente; uma câmera digital captura a emissão da luz e transforma em imagem, da qual o sistema extrai o perfil ou padrão; esse padrão é comparado com os outros do banco de dados para caracterização e identificação, e os resultados são impressos em um relatório.

Das 32 amostras, 16 foram ribotipadas com sucesso. As demais apresentaram problemas de análise. Para cada bloco de isolados (oito isolados), a análise foi concluída após oito horas, totalmente automatizada.



Fonte: Adaptado de <www.qualicon.com>

Figura 7 – Funcionamento do *Sistema Ribo Printer*® (Qualicon Company).

3.2.2. Determinação da carga elétrica superficial dos ribogrupos de *Bacillus cereus*

A carga elétrica superficial de cada um dos ribogrupos de *B. cereus* foi determinada por resinas de troca iônica em cromatografia de interação eletrostática (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Um isolado representante de cada ribogrupo foi escolhido aleatoriamente, e as análises de carga elétrica foram conduzidas com o uso das colunas *SP Sepharose XL* e *Q Sepharose XL* (tamanho da coluna: 5 x 1 mL; forma da partícula: esférica, com 45 - 165 µm e tamanho da partícula: 90 µm) consideradas fortes, uma catiônica e outra aniônica, respectivamente da GE Healthcare®.

A metodologia seguida foi como sugerido pelo fabricante: i) os isolados foram previamente ativados por transferência para caldo BHI, a 32°C, por 24 horas e, posteriormente, por mais 24 horas); ii) 1 mL da cultura foi transferido para tubos *ependorff* e centrifugado a 6.000 rpm por cinco minutos a 5 °C; iii) o sobrenadante foi descartado e, então, adicionado 1 mL de tampão *starter* ao decantado para nova centrifugação, sendo esse procedimento repetido por três vezes; iv) a massa celular foi ressuspensa com 1 mL de tampão *starter*, e a partir daí foram feitas diluições decimais em água peptonada 0,1%, para a semeadura em superfície em placas contendo ágar PCA para contagem da população inicial de células; v) as colunas de troca iônica foram purificadas, por injeção de 5 mL de tampão *starter*, 5 mL de tampão *elution* e 5 mL de tampão *starter* novamente, nessa ordem, na velocidade de 1 mL por minuto (Figura 8); vi) 1 mL da massa celular retirada do tubo *ependorff* foi diluído em 4 mL de tampão *starter*; vii) aplicaram-se 3 mL da amostra, então, nas colunas, na velocidade de 1 mL por minuto; viii) o material extraído da coluna foi coletado em tubo identificado como tubo de número 1; ix) as colunas foram lavadas com 5 mL de tampão *starter*, na velocidade de 1 mL por minuto, sendo o eluente coletado em um tubo identificado como tubo de número 2; e x) as colunas foram lavadas com 5 mL de tampão *elution* e o último eluente, coletado em tubo de número 3.

O tampão *starter* foi diferente em cada coluna: na coluna catiônica, utilizou-se tampão fosfato monobásico a 50 mM, pH 7,7; e na coluna aniônica, usou-se Tris HCL a 20 mM, pH 8,6. O tampão *elution* foi constituído do tampão *starter* de cada coluna, com a adição de 58,5 g de NaCl por litro.

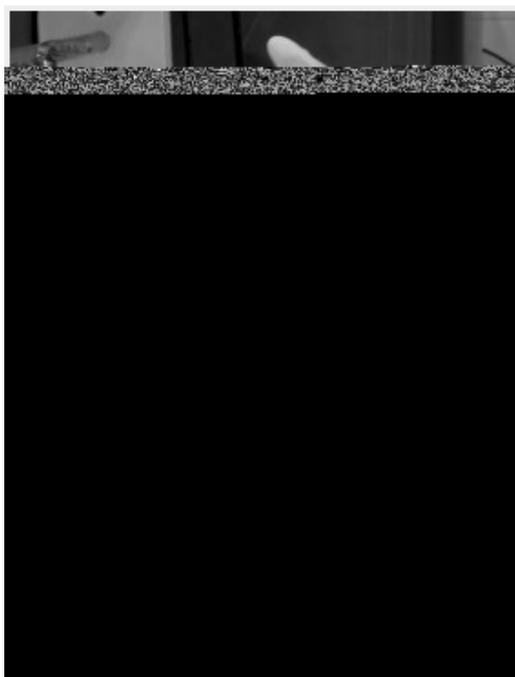


Figura 8 – Análise da carga elétrica superficial de isolados de *Bacillus cereus*, por meio de colunas cromatográficas.

Dos tubos 1 e 2, foram realizados plaqueamentos em profundidade de 1 mL do eluente, em ágar PCA (ágar para contagem-padrão em placas), para contagem das células que não permaneceram adsorvidas na coluna.

Após toda a análise, as colunas foram regeneradas, com a passagem de 5 mL de tampão *elution*; 5 mL de tampão *starter*; 5 mL de álcool 20%, em acetato de sódio, nessa ordem, à velocidade de 1 mL por minuto. Assim regeneradas, as colunas foram guardadas fechadas, em recipiente esterilizado, sob refrigeração (4 °C), para utilização posterior.

Para o cálculo da carga elétrica relativa de cada ribogruppo encontrado após a ribotipagem, o número de células que ficaram adsorvidas nas resinas de troca iônica durante o processo foi comparado com o número inicial de células microbianas inserido nas colunas, e a porcentagem de células adsorvidas foi calculada tanto para a coluna *SP Sepharose XL* quanto para a *Q Sepharose XL*.

3.3. Avaliação em uso simulado de procedimentos de higienização CIP (*Cleaning In Place*) no controle de células de *Bacillus cereus* aderidas à superfície de aço inoxidável

Amostras de 100 mL de leite esterilizado (UHT) foram adicionadas, individualmente, de 1 mL de suspensão de *B. cereus* (cerca de $1,0 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹). A suspensão, preparada com microrganismo isolado de leite pasteurizado, provinha da cultura jovem, em BHI a 32 °C por 24 horas. Tais amostras foram adicionadas a quatro tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento N^o 4, com 33 cm de comprimento e diâmetro de 3,1 cm (Figura 9), usados na avaliação de procedimentos de higienização CIP, segundo a metodologia descrita por Gilmour et al. (1993).



Figura 9 – Tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento n^o 4, com 33 cm de comprimento, diâmetro de 3,1 cm e extremidades fechadas com tampas rosqueáveis.

Os tubos de prova foram submetidos a movimentos rotatórios, colocando-os em uma superfície plana a partir de um ponto central e movimentando-os três vezes, no sentido longitudinal para cima, três vezes longitudinalmente para baixo, três vezes no sentido lateral para a direita, três vezes lateralmente para a esquerda e, por fim, três movimentos tipo baliza, realizados manualmente. Esse procedimento de movimentos rotatórios foi realizado por seis vezes seguidas, sobre um molde quadrado (46 cm de dimensão), delimitado na bancada do laboratório (Figura 10).

Em seqüência, os tubos foram incubados a 4 °C, por seis horas, para promover o processo de adesão do microrganismo no aço inoxidável. A temperatura e o tempo de adesão simularam as condições de armazenamento de leite entre a pasteurização e o envase. Após a adesão, os tubos de prova foram submetidos a diferentes procedimentos de higienização (Tabela 4).

O processo de adesão do microrganismo e os procedimentos de higienização foram realizados por cinco dias consecutivos, durante cinco semanas, e cada semana representou uma repetição.

Após o quinto dia, o número de células aderidas às superfícies dos tubos de prova e que resistiram aos procedimentos de higienização foi determinado da seguinte forma: inicialmente, as células sésseis foram removidas pelo preenchimento dos tubos de prova com 100 mL de solução *Ringer* (0,45 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 0,021 g.L⁻¹ de cloreto de potássio, 0,012 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio anidro, 0,01 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio e 10 g.L⁻¹ de tiosulfato de sódio); os tubos foram submetidos a seis movimentos tipo baliza, sendo a solução *Ringer* descartada.

Novamente, os tubos foram preenchidos com 100 mL de solução *Ringer* e as células aderidas, removidas das paredes dos tubos, usando-se uma haste de aço inoxidável (Figura 11), tendo em uma das extremidades um disco de neopreno com 3,25 cm de diâmetro. O disco de neopreno apresentava quatro orifícios de 3 mm de diâmetro cada, distribuídos um em cada quadrante, uniformemente, para a passagem da solução *Ringer*.

Essa haste foi empurrada até o fundo dos tubos de prova, por seis vezes seguidas. Esses tubos foram fechados novamente, para que a solução *Ringer* permanecesse em contato com a superfície por um minuto e então, mais uma vez, submetidos aos movimentos rotatórios.

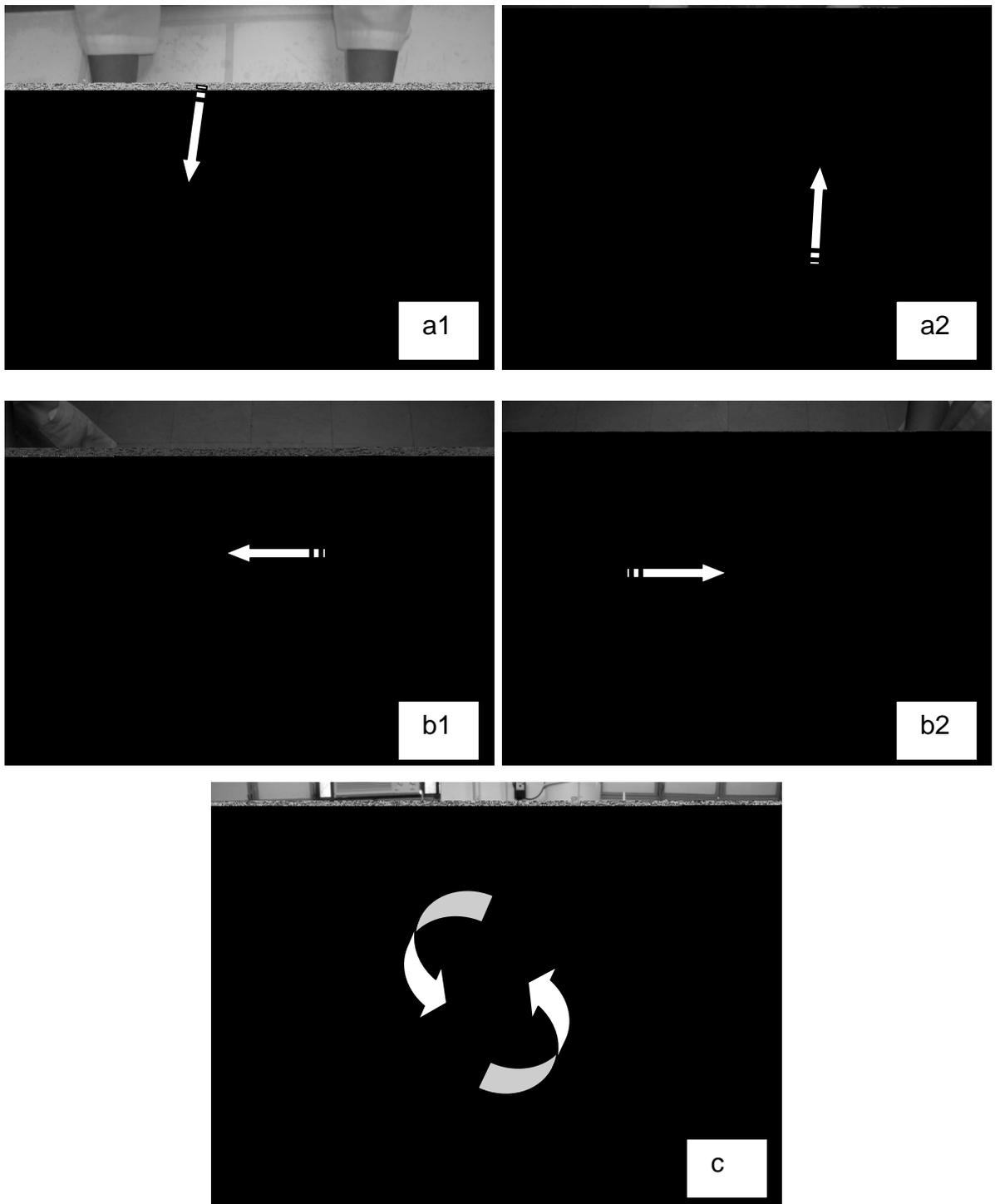


Figura 10 – Movimentos rotatórios, no sentido longitudinal para baixo (a1), longitudinal para cima (a2), lateral para a esquerda (b1), lateral para a direita (b2) e tipo baliza (c).

Tabela 4 – Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) de higienização dos tubos de prova aderidos com *Bacillus cereus*

Tubos de Prova	Procedimento Operacional Padronizado de Higienização
Controle	<p>Descarte do inóculo; pré-lavagem com água destilada a 25 °C; lavagem com solução 1% de alcalinidade cáustica, preparada a partir de hidróxido de sódio comercial, adicionada de 0,04% de EDTA e 0,01% de dodecil sulfonato de sódio, de pH 13, a 60 °C; enxágüe com água destilada a 40 °C; lavagem com solução 1% de acidez total, preparada a partir de HNO₃, de pH 1,5, à temperatura de 25 °C; enxágüe com água destilada a 25 °C; e, por fim, sanitização com 100 mg.L⁻¹ de cloro residual total (CRT), preparado a partir de dicloroisocianurato de sódio, com pH entre 7,0-7,5, a 25 °C. Obs.: Após o preenchimento dos tubos-teste com as soluções alcalina, ácida e sanitizante, os tubos foram submetidos aos rolamentos, conforme previamente mencionados.</p>
A	<p>O procedimento A foi semelhante ao controle, com as seguintes modificações: o dodecil sulfonato de sódio foi excluído da formulação alcalina e a sanitização, realizada com 50 mg.L⁻¹ de CRT.</p>
B	<p>O procedimento B foi semelhante ao controle, com as seguintes modificações: a solução alcalina foi constituída de apenas 0,5% NaOH, de pH 12,8, à temperatura de 25 °C, e a solução sanitizante continha 50 mg.L⁻¹ de CRT, com pH ajustado para 10.</p>
C	<p>O procedimento C foi semelhante ao controle, com as seguintes modificações: lavagem com água destilada a 50 °C; a solução alcalina foi constituída de apenas 0,5% de NaOH, à temperatura de 25 °C; e a solução sanitizante utilizada continha 50 mg.L⁻¹ de CRT, com pH ajustado para 10. Não foi utilizada a solução ácida.</p>

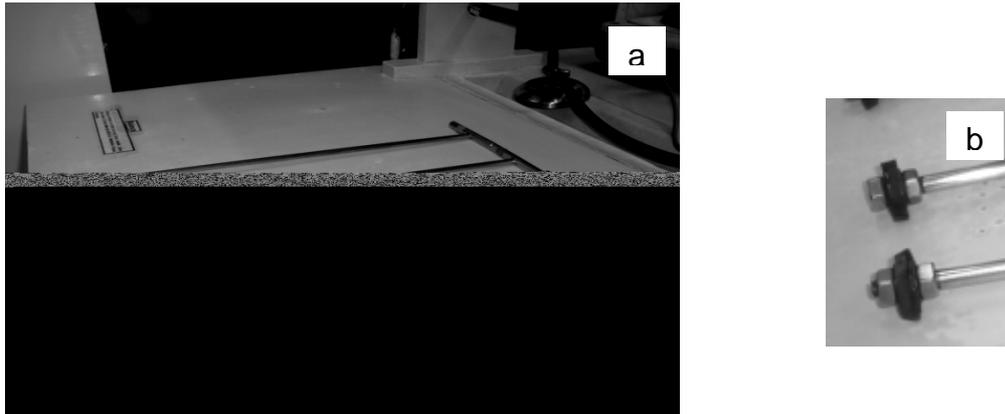


Figura 11 – a) Haste de aço inoxidável com disco de neopreno (3,25 cm de diâmetro) em uma das extremidades e b) detalhe do disco de neopreno.

A partir da rinsagem final com solução *Ringer*, foram realizadas diluições apropriadas, que foram inoculadas em profundidade, em placas contendo ágar para contagem total, com incubação a 32 °C, por 24 horas, segundo metodologia da APHA (2001) para determinação de *B. cereus*. Os resultados foram expressos em UFC·cm⁻².

Um esquema ilustrativo da metodologia de análise descrita para a avaliação da prevalência de *B. cereus* em superfícies e no leite pasteurizado, para a ribotipagem dos isolados encontrados, para a análise de carga elétrica superficial dos ribogrupos encontrados e para a avaliação dos procedimentos de higienização nos tubos de prova é apresentado na Figura 12.

3.4. Análise dos resultados

Para a análise da contaminação por *B. cereus* do leite pasteurizado e das superfícies de equipamentos, as contagens expressas como <10 UFC·cm⁻² foram consideradas como 9 UFC·cm⁻², bem como as contagens expressas em <1 UFC·cm⁻² foram tomadas como 0,9 UFC·cm⁻², cujos dados foram transformados em log UFC·cm⁻².

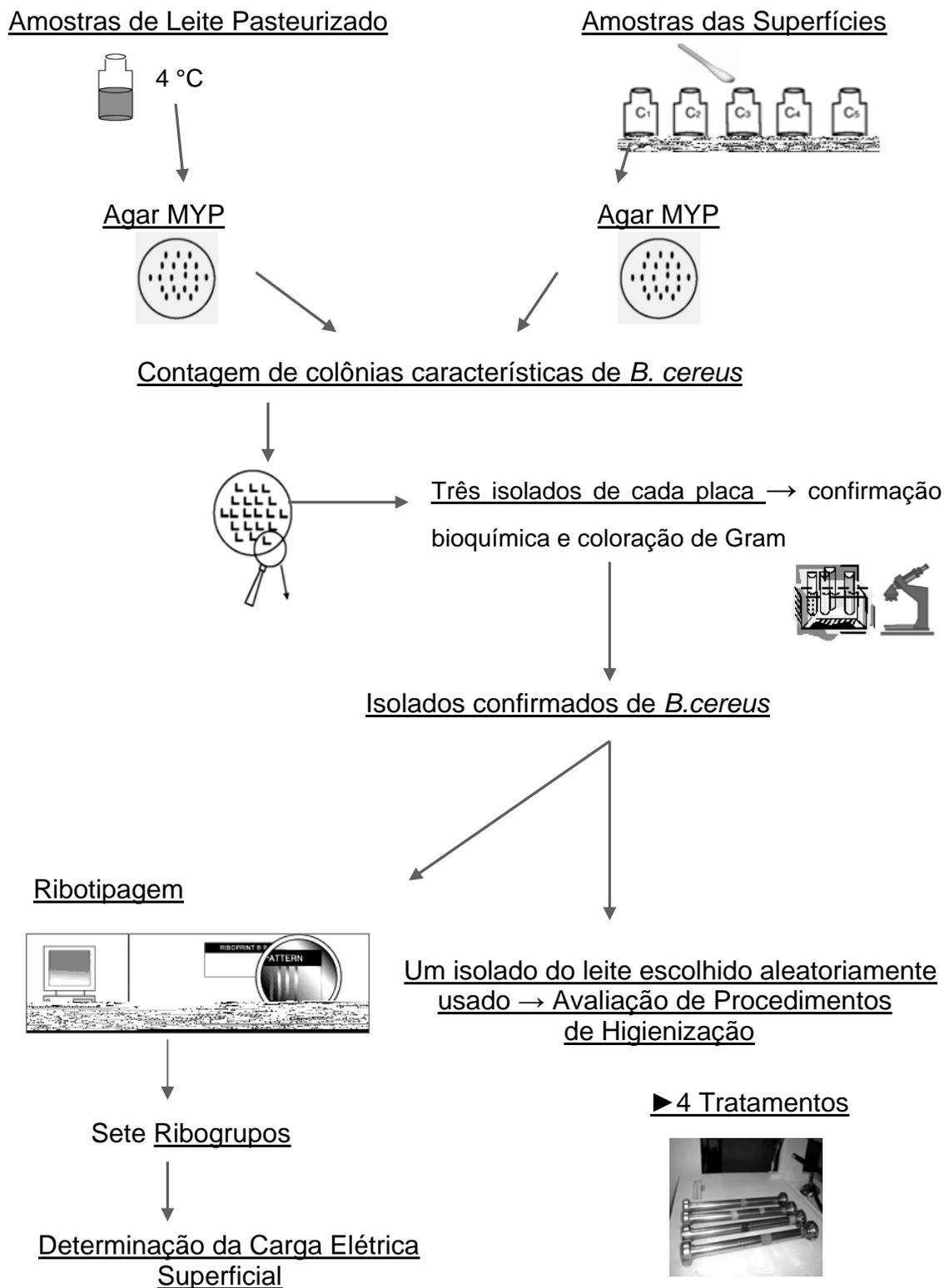


Figura 12 – Esquema ilustrativo da metodologia de análise seguida para a avaliação da prevalência de *Bacillus cereus* em superfícies e no leite pasteurizado, ribotipagem dos isolados, análise de carga elétrica superficial e avaliação dos procedimentos de higienização nos tubos de prova.

Para o monitoramento dessas contagens ao longo de nove semanas, foram construídos gráficos de controle \bar{X} / barra de Shewhart ($k=3$ e $\alpha=0,0027$), para o monitoramento da média do log UFC-cm⁻², no leite e nas superfícies avaliadas. Nesse caso, contagens que superaram o limite superior de controle (LSC) indicaram incidências de *B. cereus* acima da média ocorrida na indústria, ou seja, apontaram situações em que os controles não foram efetivos. Além disso, foi verificado se havia evidências de tendências no aumento das contagens ao longo das nove semanas. Para tanto, foi aplicado o teste z ($\alpha=0,05$), com o objetivo de testar se existia autocorrelação entre as contagens subseqüentes.

Para estudar a carga elétrica, foi realizado um experimento fatorial 7x2, referente aos fatores “ribogruppo” e “resina de troca iônica”, sob o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Realizou-se o teste F da análise de variância, bem como o teste de Tukey, de acordo com a significância da interação ($\alpha=0,05$).

Os quatro diferentes procedimentos de higienização realizados nos tubos de prova foram analisados por meio de análise descritiva dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da contaminação por *Bacillus cereus* em superfícies e em leite pasteurizado

4.1.1. Análise da contaminação de leite pasteurizado por *Bacillus cereus*

A ocorrência de *Bacillus* sp. foi constatada nas amostras de leite e nos vários pontos de amostragem após a pasteurização (Tabela 5).

Nas diversas coletas realizadas para o rastreamento de *Bacillus cereus*, foram analisadas 115 colônias típicas de *Bacillus* sp., isoladas a partir de ágar MYP, apresentando atividade de lecitinase e não fermentação de manitol (Tabela 5). Desse total, 41 colônias foram originárias do leite pasteurizado e 74 de superfícies pós-pasteurização.

Constatou-se que 30 isolados das superfícies e 12 do leite foram identificados como *B. cereus*, após a realização dos testes bioquímicos e morfotintoriais para a confirmação, ou seja, Gram-positivos e bastonetes grandes, com cerca de 3 µm de comprimento e bordas retangulares.

No leite, logo após o envase a contagem atingiu até 1,859 log UFC· mL⁻¹, com média de 0,588 log UFC· mL⁻¹.

Tabela 5 – Isolados de *Bacillus* sp. em leite e em superfícies pós-pasteurização na indústria de laticínios

Amostras	<i>Bacillus</i> sp.*	Confirmação de <i>Bacillus cereus</i> **	Identificação Positiva (%)
Rosca da tubulação da máquina de envase	12	5	41,6
Tanque de equilíbrio da máquina de envase	11	4	36,3
Tubo formador da embalagem	16	7	43,7
Bico de envase de leite	14	5	35,7
Tanque de armazenamento de leite pasteurizado	21	9	42,8
Isolados do leite pasteurizado	41	12	29,2
Isolados das superfícies	74	30	40,5
Total de isolados	115	42	36,5

* Atividade de lectinase positiva e fermentação de manitol negativa.

** Gram-positivo, motilidade positiva, crescimento rizóide negativo, fermentação anaeróbia da glucose positiva, Voges Proskauer positivo, redução do nitrato positiva e decomposição da tirosina positiva.

Observou-se que apenas na sétima semana a contaminação por *Bacillus* sp. do leite pasteurizado ultrapassou o LSC (1,22 log UFC·mL⁻¹) (P < 0,0027), chegando a 1,86 log UFC· mL⁻¹ (Figura 13).

Na primeira semana, a contagem de *Bacillus* sp. no leite atingiu o LSC. Nas outras semanas, a incidência desta estava sob controle (P > 0,0027), ou seja, entre os limites superior e inferior de controle (LIC -0,043 log UFC·mL⁻¹), de forma aleatória e sem nenhuma tendência (P > 0,05). A média estimada durante as nove semanas de coleta foi de 0,59 log UFC·mL⁻¹.

A legislação brasileira não menciona limites para a contaminação do leite pasteurizado por *B. cereus*. A Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, apenas determina padrão para contagem total de mesófilos aeróbios em placas, que é no máximo de 8,0 x 10⁴ UFC·mL⁻¹, e para coliformes totais, um máximo de 4 NMP·mL⁻¹, e estabelece a ausência de *Salmonella* sp., para o leite cru. Ainda estabelece que imediatamente após a pasterurização o leite tipo C deve apresentar enumeração de coliformes (30/35 °C) menor do que 0,3 NMP/mL da amostra (BRASIL, 2002). T12 0 a or

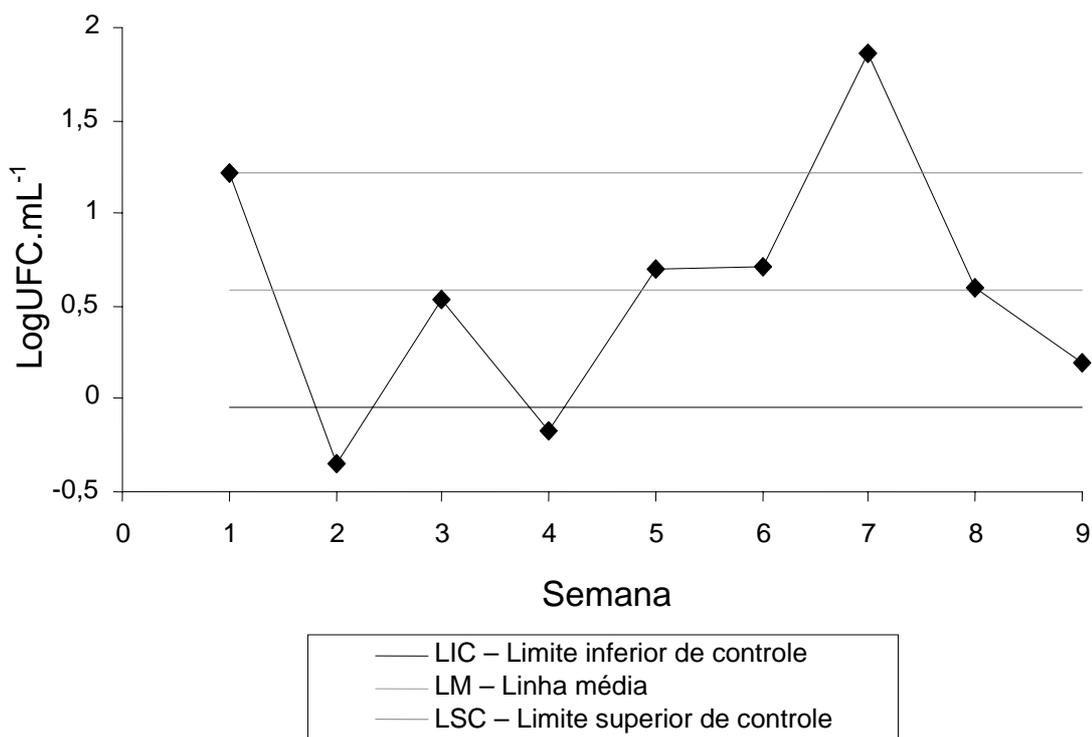


Figura 13 – Estimativas das incidências de *Bacillus cereus* no leite pasteurizado tipo C durante nove semanas de monitoramento na indústria.

Segundo pesquisadores suecos, o leite pasteurizado é tido como inapropriado para uso devido a características sensoriais insatisfatórias quando a contagem total de mesófilos aeróbios em placas atinge 10^8 UFC.mL⁻¹. Entretanto, mesmo com contagens menores, entre 10^6 e 10^7 UFC.mL⁻¹, os efeitos adversos na qualidade sensorial do produto podem ser notados. Já em se tratando de contaminação por *B. cereus*, quando as contagens atingem 10^4 UFC.mL⁻¹ no leite pasteurizado, não é mais possível o consumo do produto, tornando este inaceitável, inclusive do ponto de vista de saúde pública (ENEROTH et al., 1998).

Como os números de *Bacillus* sp. encontrados neste trabalho representam as contagens logo após o envase do produto, uma ressalva deve ser feita quanto à possibilidade de crescimento de espécies mesófilas e psicrotólicas durante o armazenamento ou consumo. Dessa forma, o número de células encontrado no leite, nesse experimento, poderia aumentar, atingindo níveis críticos, dependendo das condições de

armazenamento, considerando-se que cepas de *B. cereus* podem apresentar tempo de geração entre 26 e 57 minutos, a 30 °C,

processo estava fora de controle ($P < 0,0027$) nas duas primeiras semanas de análise em três dos cinco locais testados, em que ocorreram problemas com a higienização das superfícies, mesmo após a realização dos POPs. Apenas os resultados do tanque de equilíbrio da máquina de envase e do tubo formador da embalagem se mostraram dentro da faixa de controle ($P > 0,0027$). Os LIC e LM foram, respectivamente, de $-0,61$ e $0,646 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Entre a terceira e a sexta semanas de monitoramento, os resultados encontraram-se dentro da faixa de controle ($P > 0,0027$). Na sétima semana, porém, o tanque de armazenamento de leite pasteurizado apresentou elevação na contagem, ultrapassando o LSC ($1,353 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$) e permanecendo fora de controle nas semanas seguintes ($P < 0,0027$).

Pelo exposto, todos os locais avaliados na linha de produção são passíveis de controle, com a execução de procedimentos de limpeza e sanitização adequados. Todos eles precisam ser monitorados periodicamente, com a implementação de ações corretivas sempre que necessário, apesar da ausência ($P > 0,05$) de tendências. Outra alternativa para o problema poderia ser a revisão dos procedimentos de limpeza e sanitização utilizados para esse local, pois, nesse caso, é considerado ponto crítico de controle no processamento do produto (SHARMA; ANAND, 2002).

De acordo com as estimativas das autocorrelações de primeira ordem, apesar de uma semana não influenciar ($P > 0,05$) a incidência na semana seguinte, obtiveram-se os seguintes valores: rosca da tubulação da máquina de envase ($r_1 = 0,69$), bico de envase ($r_1 = 0,54$), tanque de armazenamento de leite pasteurizado ($r_1 = 0,64$), tanque de equilíbrio da máquina de envase ($r_1 = 0,36$) e tubo formador da embalagem ($r_1 = 0,24$). Dessa forma, alguns locais podem ser mais previsíveis quanto à contaminação por *Bacillus* sp., em função das grandezas das autocorrelações. O tanque de armazenamento de leite pasteurizado, por exemplo, na sexta semana começou a apresentar contagens mais elevadas e, então, continuou subindo tendenciosamente. Esse local exige, assim, recomendação mais específica para que, quando comece a sair da faixa de controle, uma medida corretiva seja implementada.

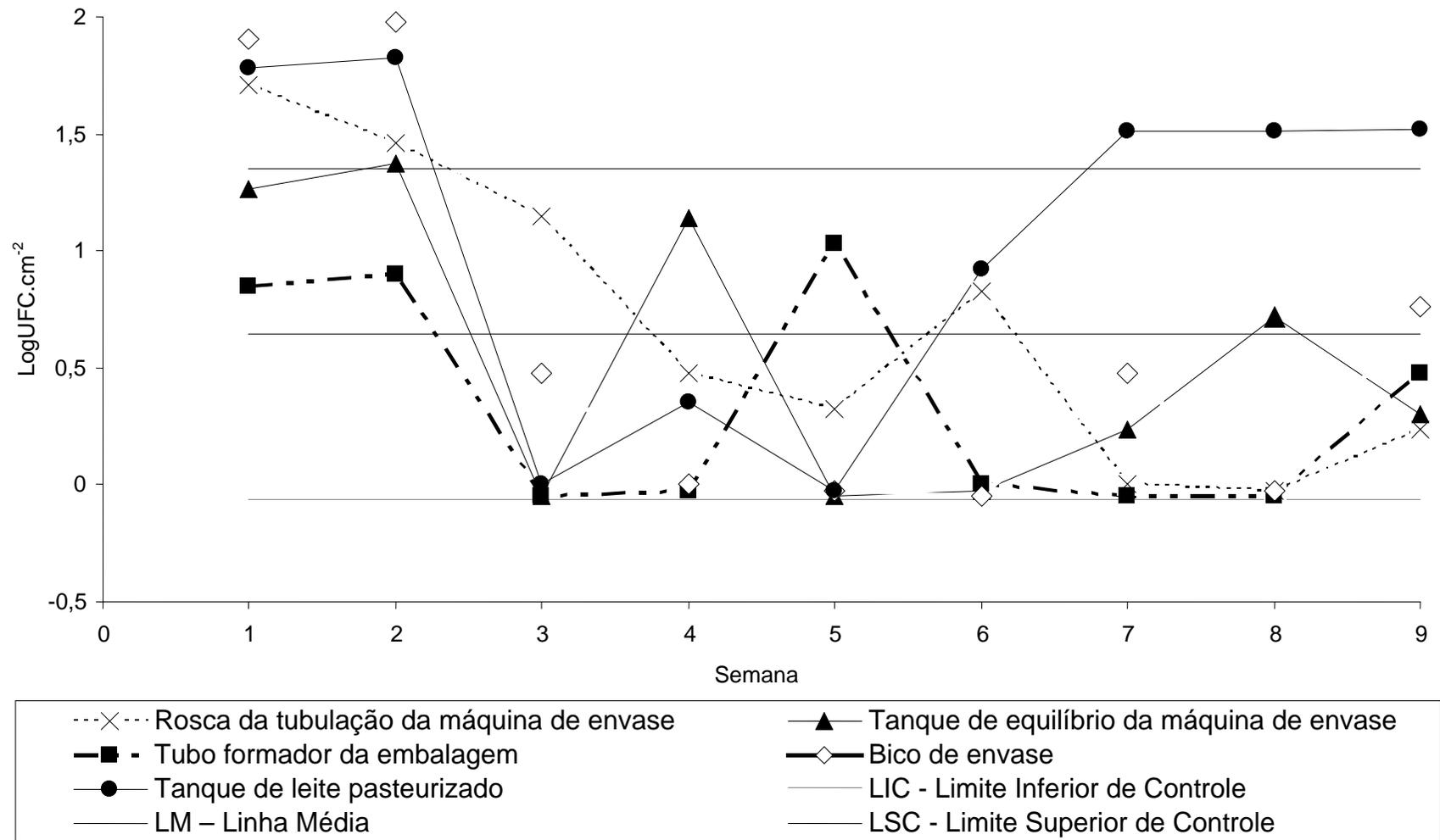


Figura 14 – Estimativas das incidências de *Bacillus* sp. nas superfícies testadas na indústria de laticínios durante as nove semanas de monitoramento.

O tanque de equilíbrio da máquina de envase e o tubo formador da embalagem, devido a flutuações erráticas, não apresentaram tendência nas contagens microbianas, não sendo, entretanto, pouco importantes do ponto de vista de controle. Devido a essas flutuações, tornam-se superfícies em que o monitoramento seria necessário, pois poderiam fugir ao controle, mesmo com um processo de higienização adequado na semana anterior. Uma hipótese para explicar esses resultados seria de que outros fatores, por exemplo o contato com a contaminação microbiológica do ar dos ambientes de processamento, estariam influenciando as contagens de *Bacillus* sp. dessas superfícies.

Entende-se, então, que as superfícies pós-pasteurização podem recontaminar o leite pasteurizado, eventualmente ou mais freqüentemente, e trazer conseqüências quanto à qualidade do leite e à extensão da sua vida útil. Assim, há necessidade de que a indústria de laticínios fique atenta ao problema e faça a adequação dos procedimentos de limpeza e sanitização dessas superfícies, bem como o monitoramento, principalmente, de superfícies consideradas críticas, como o tanque de leite pasteurizado.

Outra consideração deve, ainda, ser feita: a permanência de células bacterianas remanescentes nas superfícies dos equipamentos pode levar à formação de biofilmes ao longo do tempo.

Dados da literatura comprovam a existência desse problema em indústrias de laticínios, ou seja, a presença de biofilmes após tratamentos CIP, em diferentes pontos na linha de pós-pasteurização. Segundo Sharma e Anand (2002), o monitoramento da formação de biofilmes é essencial e deve ser considerado no desenvolvimento de planos APPCC e em especificações ISO (*International Standard Organization*): 9000. Recomenda-se que cada indústria faça uma avaliação específica sobre a prevalência de biofilmes bacterianos nos seus equipamentos e desenvolva programas de higienização efetivos para controlar esse problema.

4.2. Rastreabilidade de *Bacillus cereus* em superfícies pós-pasteurização e no leite pasteurizado e determinação da carga elétrica superficial dos ribogrupos

As análises de ribotipagem pelo *Sistema RiboPrinter*® confirmaram a caracterização dos isolados de *B. cereus*, anteriormente identificados pelos testes bioquímicos. Os 16 isolados bacterianos analisados (10 isolados do leite pasteurizado e seis isolados das superfícies de equipamentos) foram agrupados em sete ribogrupos distintos, provenientes do leite pasteurizado e das superfícies de equipamentos na indústria de laticínios.

Dentre as cinco superfícies avaliadas, quatro foram associadas com a presença de *B. cereus* no leite pasteurizado, pois o mesmo ribogrupo constatado no leite foi, também, encontrado nesses pontos, identificando-os como reservatórios do microrganismo recontaminante na linha de produção. Apenas o bico de envase do leite não foi associado à contaminação do leite pasteurizado, nas análises de rastreabilidade, por meio da determinação do perfil genético bacteriano. Entretanto, como apenas 16 isolados foram ribotipados neste estudo, não foi possível concluir que o bico de envase não seja uma fonte em potencial de contaminação do leite pasteurizado por *B. cereus*.

A maior parte dos isolados analisados pertenciam ao mesmo ribotipo, RIBO 1 222-173-S4 (Tabela 6). Nesse grupo, a rosca da tubulação da máquina de envase, o tanque de equilíbrio da máquina de envase, o tubo formador da embalagem e o tanque de armazenamento de leite pasteurizado foram associados como causa da contaminação do leite pasteurizado, pois as amostras daí isoladas apresentaram o mesmo perfil genético de outros quatro isolados bacterianos provenientes do produto, indicando uma relação de “causa e efeito” direta.

Segundo um estudo de Andersson et al. (1999), isolados de *B. cereus* na indústria de laticínios são bem heterogêneos. Amostras de ambientes de processamento de três laticínios investigados quanto aos reservatórios de *B. cereus* apresentaram 27 isolados bacterianos, e, entre esses, 24 ribogrupos diferentes foram observados após a ribotipagem por meio do *Sistema RiboPrinter*®, usando-se a metodologia-padrão que utiliza a enzima *Eco RI*.

Tabela 6 – Ribotipos de *Bacillus cereus* encontrados em superfícies pós-pasteurização do leite

Ribotipos de <i>Bacillus cereus</i> Encontrados	Número de Isolados do Leite Pasteurizado	Número de Isolados das Superfícies de Equipamentos	Total de Isolados
RIBO 1 222-173-S1	1	-	1
RIBO 1 222-173-S2	3	-	3
RIBO 1 222-173-S4	4	4	8
RIBO 1 222-174-S1	-	1	1
RIBO 1 222-174-S2	1	-	1
RIBO 1 222-174-S3	1	-	1
RIBO 1 222-174-S5	1	-	1

No estudo de Andersson et al. (1999) foi observado também que, quando a ribotipagem automática foi conduzida para avaliar isolados de *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides*, de acordo com o uso da *Eco RI*, os isolados foram separados em 34 ribogrupos diferentes. Com o uso da enzima de restrição *Pvu II*, ao empregar um procedimento diferenciado o resultado encontrado foi de 36 perfis diferentes, em que a segunda enzima separou dois dos ribogrupos da primeira, em quatro diferentes. Esse resultado permitiu concluir que ambas as metodologias, com o uso da *Eco RI* em conjunto ou não com a *Pvu II*, podem ser utilizadas para rastrear os reservatórios de *B. cereus* na indústria de laticínios e para estudos epidemiológicos dessa bactéria.

Todos os sete ribogrupos foram relativamente mais carregados anionicamente ($P < 0,05$), mas não diferiram ($P > 0,05$) entre si (Tabela 7). Além disso, não houve ($P > 0,05$) interação entre os dois fatores, sendo o coeficiente de variância (CV) residual igual a 2,66%.

Tabela 7 – Médias das cargas elétricas superficiais (%) dos ribogrupos de *Bacillus cereus* analisados em resinas catiônica e aniônica

Ribotipo	Resina de troca inônica			
	Catiônica	Aniônica	Média	
RIBO 1 222-173-S1	95,29	99,31	97,30	a
RIBO 1 222-173-S2	95,51	99,66	97,58	a
RIBO 1 222-173-S4	90,96	99,82	95,39	a
RIBO 1 222-174-S1	98,75	99,78	99,26	a
RIBO 1 222-174-S2	96,94	99,72	98,33	a
RIBO 1 222-174-S3	97,44	99,81	98,62	a
RIBO 1 222-174-S5	93,18	99,76	96,47	a
	95,44 B	99,69 A		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F ($P > 0,05$).

Vários fatores contribuem para a adesão de uma bactéria a determinada superfície e dependem não só da fisiologia do microrganismo, mas também da natureza do substrato. As células bacterianas possuem carga negativa e potencial de hidrogênio (pH) em torno de 3; nas Gram-positivas, a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e teicurônicos da parede e dos polipeptídios do glicocálix; nas Gram-negativas, dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa, em conjunto com os polímeros do glicocálix (MACÊDO, 2007).

4.3. Avaliação em uso simulado de procedimentos de higienização CIP (*Cleaning In Place*) no controle de células aderidas de *Bacillus cereus* em aço inoxidável

O processo de adesão do microrganismo *Bacillus cereus* e os procedimentos de higienização, realizados por cinco dias consecutivos, durante cinco semanas, evidenciaram que a maior eficiência da higienização

depende dos agentes detergentes e sanitizantes e, principalmente, de sua operacionalização.

O desempenho do tratamento C foi o mais instável entre os avaliados (Tabela 8). Em três das cinco repetições (Tratamento C), a contagem de *B. cereus* foi acima de 2 UFC·cm⁻², que é o valor máximo recomendado pela *American Public Health Association* – APHA (2001), para a contagem de mesófilos aeróbios, para que superfícies sejam consideradas adequadamente higienizadas, para contato com alimentos durante o processamento.

Tabela 8 – Número de células de *Bacillus cereus* (UFC·cm⁻²) aderidas ao aço inoxidável 304, n^o 4, após diferentes procedimentos de higienização, em cinco repetições

Tratamento	Repetições				
	1	2	3	4	5
Controle	<0,85	0,85	<0,85	<0,85	<0,85
A	<0,85	<0,85	<0,85	<0,85	0,85
B	<0,85	1,70	0,85	<0,85	0,85
C	25,1	0,85	2,98	<0,85	2,13

A provável razão para a menor eficiência do tratamento C comparado com o controle pode ser atribuída aos seguintes aspectos: i) a solução alcalina foi em concentração e temperatura inferiores; ii) a solução alcalina não apresentava em sua formulação agentes complexantes e nem tensoativos; iii) não foi realizada limpeza ácida; e iv) a solução clorada aplicada foi em menor concentração e o valor de pH, ajustado para 10.

Comparando o tratamento B com os tratamentos A e controle, pode-se observar, em três das cinco repetições, um número um pouco maior de células de *B. cereus* aderidas ao aço inoxidável, remanescentes após a higienização. No entanto, os números apresentaram-se dentro da

recomendação sugerida pela APHA (2001). Pode-se considerar que a eficiência do tratamento A foi bastante próxima à do controle.

Neste experimento, a remoção do agente tensoativo e o uso da solução clorada em concentração inferior parecem não ter afetado o desempenho dos tratamentos. Contudo, deve-se ressaltar o papel fundamental dos tensoativos nas formulações de detergentes, que têm o objetivo de diminuir a tensão superficial da água, facilitando o contato do detergente com a superfície e com os resíduos de alimentos. Os POPs utilizados no laticínio estudado neste trabalho poderiam ser modificados com a adição de tensoativos nas soluções detergentes, a fim de melhorar a eficiência e o desempenho dos procedimentos, com a obtenção de resultados superiores.

A temperatura elevada (60 °C) de uso do detergente alcalino (tratamentos controle e A) foi, no entanto, importante para a eliminação de células aderidas ao aço inoxidável dos cilindros (Figura 15).

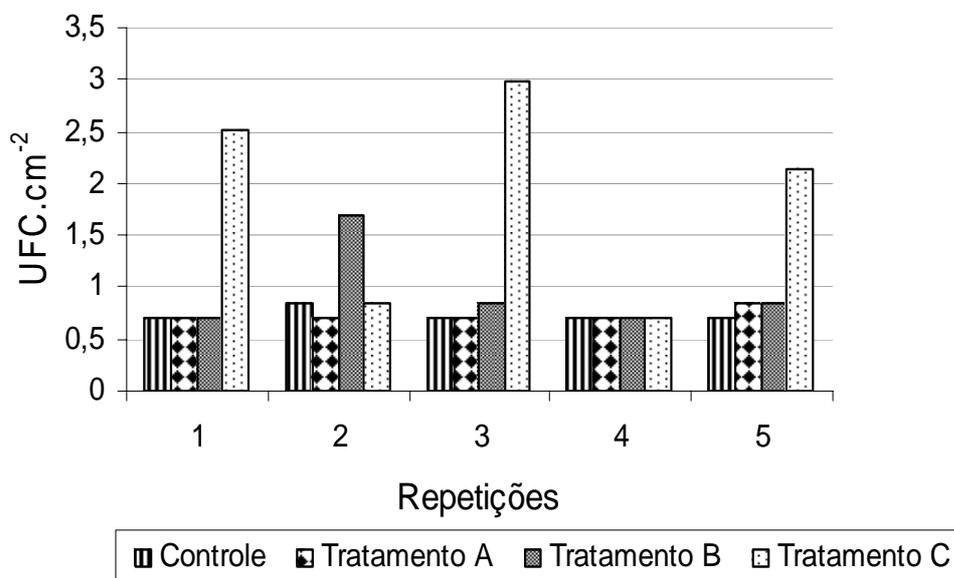


Figura 15 – Número de *Bacillus cereus* (UFC·cm⁻²) remanescentes nas superfícies de tubos de prova após diferentes procedimentos de higienização.

Neste estudo, quando o detergente alcalino foi utilizado com concentração reduzida à metade e a temperatura de 60 °C modificada para 25 °C (tratamentos B e C), a remoção de células aderidas foi prejudicada. Isso evidencia a importância da concentração do detergente alcalino e da temperatura na eficiência do procedimento de higienização CIP.

A ação do detergente é imprescindível antes do uso do agente químico sanitizante na remoção de células aderidas de *B. cereus* na indústria de laticínios (PENG et al., 2002). Schwach e Zottola (1984) demonstraram que o tratamento somente com NaClO em superfícies de aço inoxidável pareceu não interferir na ligação das fibrilas do *B. cereus* com a superfície.

Em um trabalho desenvolvido na Universidade Nacional de Taiwan, a importância do uso de detergente alcalino a temperaturas elevadas como 70 °C, na remoção de células de *B. cereus* aderidas ao aço inoxidável, foi demonstrada em procedimentos CIP em indústrias de laticínios. Cupons de aço inoxidável foram fixados no interior da linha de pasteurização de leite, e o procedimento de higienização foi executado da seguinte maneira (PENG et al., 2002): i) tratamento 1,5% de alcalinidade cáustica a partir de detergente alcalino por três minutos; ii) rinsagem com água fria por três vezes (um minuto cada vez); iii) tratamento 0,65% de acidez total a partir de detergente ácido por 10 minutos; iv) rinsagem com água fria por mais três vezes; v) tratamento com solução de 50 mg.L⁻¹ de cloro residual total, contendo detergente alcalino (Diverform Plus – 1,5%), por 10 minutos; e vi) última rinsagem com água fria, por três vezes. Esse procedimento de higienização não foi suficiente para a remoção completa de biofilmes na indústria de laticínios. Os números de *B. cereus* do biofilme nos cupons reduziram-se em 2,44 log UFC/cupom. No tratamento-controle, em que os detergentes foram substituídos por água, havendo somente a manutenção do sanitizante, a redução foi de 1,11 log UFC/cupom.

Quando, entretanto, cada etapa desse procedimento CIP foi avaliada separadamente, uma conclusão interessante foi observada: a maior redução ocorreu essencialmente durante o uso do detergente alcalino e sua posterior rinsagem. Os tratamentos subsequentes, com o detergente ácido e os sanitizantes usados, não resultaram em redução significativa na população

de *B. cereus*. A partir desses resultados, constatou-se que a população residual presente nos cupons, após o tratamento com o detergente alcalino, parece ser resistente ao detergente ácido e ao sanitizante usado (PENG et al., 2002).

A importância do detergente alcalino na remoção de células bacterianas de *B. cereus* aderidas ao aço inoxidável ficou mais evidente quando o tempo de contato do agente alcalino foi estendido para 10 minutos. Houve uma redução de 2,62 log UFC/cupom.

Ainda, o uso do detergente alcalino a 70 °C apresentou resultados surpreendentes. A população inicial de células aderidas de 6,41 log UFC/cupom reduziu para 0,44 log UFC/cupom, ou seja, 5,97 log UFC/cupom de redução, quando a temperatura de uso do detergente foi de 70 °C, com 10 minutos de exposição. No entanto, a importância do uso de agentes químicos sanitizantes deve ser ressaltada. A etapa de sanitização é responsável pela inativação dos microrganismos, evitando, assim, sua redeposição em outros pontos, a formação de biofilmes e a contaminação do alimento (GIBSON ET AL., 1999). Assim, o processo de higienização deve compreender as etapas de limpeza e sanitização, que são complementares para garantir a qualidade microbiológica da superfície que processa alimento na indústria de alimentos (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

O mesmo estudo de Taiwan avaliou a ação do hipoclorito de sódio no controle de *B. cereus* em indústrias de laticínios, nas concentrações de 25 e 50 mg.L⁻¹ de cloro residual total, expresso em Cl₂. Em ambos os casos, esse agente químico sanitizante mostrou ser eficiente na inativação de células planctônicas, com uma redução de 5,5 log UFC.mL⁻¹ nos números de *B. cereus*, após 15 segundos de exposição (PENG et al., 2002).

No mesmo estudo, entretanto, quando o mesmo experimento foi conduzido com células aderidas ao aço inoxidável, nos cupons fixados nas tubulações da linha de processamento de leite pasteurizado, essas células apresentaram maior resistência ao sanitizante. Houve redução de 4 log UFC/cupom, após 30 segundos de exposição, com o uso de 50 mg.L⁻¹ de CRT, preparada a partir de solução do hipoclorito de sódio.

Ainda, foram usados cupons de aço inoxidável contendo biofilmes formados a partir da adesão de *B. cereus* em superfícies com resíduos de

leite. Nesse caso, os resultados indicaram maior resistência das células microbianas do biofilme ao agente químico. Apenas 0,94 e 1,51 log UFC/cupom de redução na população bacteriana foram observadas, após uma exposição de 30 segundos e 300 segundos, respectivamente, a 50 mg·L⁻¹ de CRT.

Para serem considerados agentes sanitizantes efetivos, um agente químico deve inativar bactérias planctônicas em pelo menos cinco ciclos log UFC, em 30 segundos, a 20 °C. Já nas células sésseis, um agente químico é considerado efetivo quando reduz a contagem inicial em 3 ou mais ciclos log (99,9%), em 30 segundos, a 20 °C (MOSTELLER; BISHOP, 1993; SHARMA; ANAND, 2002). Assim, no estudo de Taiwan, nas duas concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas a sanitização não foi efetiva no controle de biofilmes de *B. cereus* em superfícies de aço inoxidável.

Outros estudos também encontraram resultados similares, indicando que o cloro possui uma penetração limitada na matriz de exopolissacarídeos que protege os microrganismos nos biofilmes (MOSTELLER; BISHOP, 1993).

A partir do exposto, a indústria deve enfatizar os procedimentos de higienização, enfocando as etapas de pré-lavagem, usos de detergentes, enxágüe e sanitização. Devem ser fornecidas informações que incluem concentração, pH, tempo e temperatura de contato das soluções detergentes e sanitizantes.

A avaliação fundamenta-se em análises microbiológicas realizadas após os procedimentos de higienização, para o adequado monitoramento do processo, que deve ser capaz de detectar qualquer desvio do padrão de qualidade (perda do controle) para que ações corretivas possam ser tomadas, quando fundamentadas e necessárias.

5. CONCLUSÕES

De acordo com o monitoramento das nove semanas de amostragem, as contagens de *Bacillus* sp. no leite pasteurizado variaram até 1,86 log UFC·mL⁻¹, com média de 0,59 log UFC·mL⁻¹, sendo o LSC de 1,22 log UFC·mL⁻¹ e LIC de -0,043 log UFC·mL⁻¹.

Na primeira semana de monitoramento, o número de *Bacillus* sp. encontrados no leite atingiu o LSC, e na sétima semana a contaminação ultrapassou consideravelmente esse valor. Nas outras semanas, a incidência de *Bacillus* sp. esteve sob controle, ou seja, abaixo do LSC, e de forma aleatória, sem nenhuma tendência.

As contagens de *Bacillus* sp. em superfícies de aço inoxidável AISI 304, nº 4, avaliadas pós-pasteurização, situaram-se abaixo de 1,98 log UFC·cm⁻², com uma média de 0,65 log UFC·cm⁻².

O processo de higienização estava fora de controle nas duas primeiras semanas de análise em praticamente todos os locais testados, e ocorreram problemas com a higienização das superfícies, mesmo após os POPs serem realizados. Apenas o tubo formador da embalagem permaneceu dentro da faixa de controle. O tanque de equilíbrio da máquina de envase atingiu o LSC de 1,35 log UFC·cm⁻². Os outros locais fugiram ao controle, ultrapassando esse limite. Na sexta semana, o tanque de armazenamento de leite pasteurizado apresentou elevação e ultrapassou o LSC na semana seguinte, sendo considerado um ponto crítico de controle.

Todos os locais avaliados na linha de produção são cabíveis de monitoramento e controle, com a execução de procedimentos de limpeza e sanitização adequados.

Constatou-se que a eficiência ou não da higienização em superfícies de equipamentos em uma semana não influenciou o resultado da higienização na semana seguinte.

Sete ribogrupos foram encontrados, e um mesmo ribogrupo foi isolado de quatro superfícies e de amostras de leite pasteurizado, indicando ser estas reservatórios de *B. cereus*. Apenas o tubo de envase não foi associado à recontaminação.

De acordo com as análises de cromatografia por interação eletrostática dos ribogrupos, estes se apresentaram predominantemente aniônicos.

A adesão de *B. cereus* às superfícies de aço inoxidável AISI 304, nº 4, avaliada nos tubos de prova após diferentes procedimentos de higienização, foi afetada pela temperatura e concentração da solução alcalina, uso ou não da solução ácida e pelo pH da solução clorada.

Respondendo ao objetivo geral deste trabalho, a ocorrência de *B. cereus* foi constatada no leite pasteurizado e na rosca da tubulação da máquina de envase, no tanque de equilíbrio da máquina de envase, no tubo formador da embalagem e no tanque de leite pasteurizado.

A indústria deve enfatizar, portanto, o “como fazer” de procedimentos de higienização e sua operacionalização. Também, o “como avaliar” deve ser considerado, sendo importante para o monitoramento do processo, para que ações corretivas possam ser tomadas, de forma mais rápida possível.

6. REFERÊNCIAS

AANTREKKER, E. D. et al. Quantifying recontamination through factory environments – a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 80, p. 117-130, 2002.

ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, n. 28, p. 145-155, 1995.

ANDERSSON, A. et. al. Comparison between automatic ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus cereus* isolates from the dairy industry. *International Journal of Food Microbiology*, v. 47, p. 147-151, 1999.

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

APHA. **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. APHA, 2001. cap. 3, p. 25-35.

ATTADIA, L. C. L.; MARTINS, R. A. Medição de desempenho como base para evolução da melhoria contínua. *Revista Produção*, v. 13, n. 2, 2003.

BAHOUT, A. A. Prevalence of *Bacillus* species in UHT milk. *Assoc. Vet. Med. J.*, v. 42, p. 47-53, 2000.

BAKKER, D. P.; BUSSCHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C. Bacterial deposition in a parallel plate and a stagnation point flow chamber: microbial adhesion mechanisms depend on the mass transport conditions. *Microbiology*, v. 148, p. 597-603, 2002.

BOOR, K.J. ADSA Foundation Scholar Award - Fluid Dairy Product Quality and Safety: Looking to the Future. **J. Dairy Science**, v. 84, p. 1-11, 2001.

BOOR, K.J. **NYS fluid milk product shelf-life extension through elimination of spoilage microorganisms**. Cornell. Food Science Department - Cornell University, 2003. (Comunicação via e-mails).

BOTSTEIN, D.; WHITE RL; SKOLNICK, M.; DAVIS R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum Genet.**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 368, de 04/09/1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e das boas práticas de fabricação nos estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial**, Brasília: Ministério da Agricultura, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Decreto n. 81.771, 7. Jun. 1978. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de ago. 1993. Seção 1, p. 11937.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v.1, 2002.

BROWN, K. L. Control of bacterial spores. **Brit Med Bull**, v. 56, p. 158-171, 2000.

BRUCE, A. et al. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre/Brasil: Artmed; 1997. 1294 p.

BRUCE, J. Automated System Rapidly Identifies and Characterizes Microorganisms in Food. **Food Technology**, p. 77-81, 1996.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substratum. **FEMS Microbiology**, v. 46, p. 165-173, 1987.

CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R. R.; ROY, D.; MAFRE, A.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.

CHEN, G.; ZHU, H. Bacterial adhesion to silica sand as related to Gibbs energy variations. *Colloids and Surfaces B*. **Biointerfaces**, v. 44, p. 41-48, 2005.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n.1, p. 22-32, 2003.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, Jan. 1981.

COLLINS, S. J.; BESTER, B. H.; MCGILL, A. E. J. Influence of psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. **Journal Food Protection**, v. 56, n. 5, p. 418-425, 1993.

COSTERTON, J. W. et. al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 435-464, 1987.

CRIELLY, E. M.; LOGAN, A.; ANDERTON, A. Studies on the Bacillus flora of milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 256-263, mar. 1994.

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

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 130-138, jan. 2003.

DUPONT BRASIL. **Owned By BiyoSecurityTeam**. Sala de Imprensa/Notícia de 10 julho de 2006. Disponível em: <http://www.dupont.com.br:80/salaimprensa/index.asp?conteudo_id=1&releasse_id=217>. Acesso em: 13 jun. 2007.

ENEROTH, A. et. al. Critical Contamination Sites in the Production Line of Pasteurized Milk, with Reference to the Psychrotrophic Spoilage Flora. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 829, 834, 1998.

EVANCHO, G. M.; SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; FRANK, J. F. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. APHA, 2001. cap. 3, p. 25-35.

FELLOWS. **Tecnologia del procesado de los alimentos: Principios Y prácticas**. Zaragoza (Espanha): Editorial Acribia S.A., 1994. 549 p.

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. Viçosa, MG: UFV, 2000. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

FONSECA, C. R. et al. Qualidade do leite de cabra *in natura* e do produto pasteurizado armazenados por diferentes períodos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 944-949, out.-dez. 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FOSCHINO, R.; GALLI, A.; OTTOGALLI, G. Research on the microflora of UHT milk. **Ann. Microbiol.**, v. 40, p. 47-59. 1990.

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

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Hig. Aliment.**, v.14, p. 70-77, 2000.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy product**. Washington, DC: American Public Health, 1992. p. 271-281.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. 4th ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 677 p.

FROMM, H. I.; BOOR, K. J. Characterization of Pasteurized Fluid Milk Shelf-life Attributes. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 207-214, 2004.

GARRIDO, N. S. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 141-146, 2001.

GIBSON, L. L.; ROSE, J. B.; HAAS, C. N. Use of quantitative microbial risk assessment for evaluation of the benefits of laundry sanitation. **American Journal of Infection Control**, v. 27, n. 6, p. 34-39, 1999.

GILMOUR, A.; WILSON, A. B.; FRASER, T. W. Microbial Adherence to Food Contact Surfaces. In: DENYER, S. P.; GORMAN, S. P.; SUSSMAN, M. **Microbial biofilms: formation and control**. Oxford; Boston: Blackwell Scientific Publications, 1993. cap. 18. 352 p.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1988. 85 p.

GOUNOT, A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederlands Melk en Zuiveltijds**, Chicago, n. 42, p. 1192-1197, 1986.

GRAM, L. et al. Food spoilage – interactions between food spoilage bacteria. International **Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 79-97, 2002.

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

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

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

JANSTOVÁ, B.; DRAKOVÁ, M.; VORLOVÁ, L. The effect of lipolytic enzymes of bacillus spp. on quality of ultra-high-temperature-treated. **Acta Vet Brno.**, v. 75, p. 427-435, 2006.

JOHNSTON, D.W.; BRUCE, J. Incidence of thermotolerant psychrotrophs in milk produced in west of Scotland. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, n. 3, p. 333- 337, mar. 1982.

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

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes Infect**, v. 2, p. 189-198, 2000.

LAWRENCE, K.; CREAMER, LINDSAY E.; PEARCE, JEREMY; HILL, P.; MIKE, J.; BOLAND. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 7187-7193, 2002.

LEITE, Z. T. C.; VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 876-880, 2006.

LOPES, A. C. S.; STANFORD, T. L. M. Pontos críticos de controle no fluxograma de beneficiamento do leite pasteurizado. **Archivos latinoamericanos de Nutricion**, v. 47, n. 4, 1997.

MA, Y. et al. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 264-274, 2000.

MACÊDO, J. **Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria Farmacêutica**. Águas e Águas. Disponível em: <<http://www.aguaseaguas.ufjf.br/ARTIGOBiofilmebacterianosWeb.PDF>>. Acesso em: 5 jul. 2007.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI, O. D.; LAGO, N. C. R. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

MAUKONEN, J. J. et al. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: A review. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 327-356, 2003.

MAZANO, M. et al. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 249-254, 2003.

MEER, R. R.; WODBURN, M. J.; BODYFELT, F. W. Identification and characterization of heat-resistant psychrotrophic bacteria in Oregon grade A raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 13, n. 11, p. 631-637, 1993.

MILAGRES, R.C.M. ***Bacillus cereus* em unidades de alimentação e nutrição**: avaliação da contaminação do ar e de superfícies de trabalho. Viçosa, MG: UFV, 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Resolução do **DIPOA/SDA** Nº 10, de 22 de maio de 2003. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - Institui o Programa Genérico de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional, PPHO, a ser utilizado nos Estabelecimentos de Leite e Derivados que funcionam sob o regime de Inspeção Federal, como etapa preliminar e essencial dos Programas de Segurança Alimentar do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). Brasília, 2003.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico da qualidade**. Tradução de Ana Maria Lima de Farias e Vera Regina Lima de Faria e Flores 4 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora AS, 2004. 513 p.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E. Efeito das várias etapas do processamento de requeijão e queijos fundidos na microbiota do leite. Caderno **Fazer Melhor**, Mar./Abr., 2002. Disponível em: <http://www.revistalaticinios.com.br/main_frame/revista/ed_38/pdfs/fazermelhora.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2007.

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

MUIR, D. D. Quality of pasteurised milk and cream produced by on-farm Dairies. **Communicable Disease and Public Health**, v. 7, n. 2, p. 90-91, jun. 2004.

NERO, L. A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan.-mar. 2005.

OLIVEIRA, K. M. P. **Adesão de *Salmonella enteritidis* em diferentes superfícies de processamento de alimentos.** Londrina, PR: UEL, 2006. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; TEIXEIRA, P. The importance of physicochemical properties in biofilm formation and activity. **Biofilms in wastewater treatment**, 2003.

PENG, J. L.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 105-111, 2001.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **Int. J. Food Microbiology**, v. 77, p. 11-18, 2002.

QUALICON/DU PONT COMPANY – **RiboPrinter**. Disponível em: <<http://www.qualicon.com>>. Acesso em: 2004.

RALYEA, R.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 10, p. 1336-1340, 1998.

RAVANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 164-167, 1995.

RIBEIRO JR., J. I. **EST 633** – Estatística no controle de qualidade. Viçosa, MG: UFV, DPI, 2007. (Apostila).

ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology: the microbiology of milk.** 2. ed. New York: Elsevier Applied Science, 1990. v.1.

SANTANA, E. H. W. et al. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ci. Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 145-154, jul./dez. 2001. Disponível em: <http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina_22_2_19_7.pdf>. Acesso em: 21 maio 2007.

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

SCHRAFT, H. et al. Epidemiological typing of *Bacillus* spp. isolated from Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4229-32, 1996.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v. 49, n. 8, p. 432-437, 1994.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/ dairy processing industry — a case. **Food Control**, v. 13, p. 469-477, 2002.

SHARMA, P. K.; HANUMANTHA RAO, K. Adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on chalcopyrite and pyrite: surfaces thermodynamics and extended DLVO theory. *Colloids and Surfaces*. **Biointerfaces**, v. 29, p. 21-38, 2003.

SPEXOTOL, A. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; OLIVALL, A. A. Aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em propriedade leiteira tipo A. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1424-1430, nov.-dez. 2005.

SILVA, M. H. **Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físicoquímicas do leite**. Viçosa, MG: UFV, 1990. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVEIRA, I. A. et al. Verification of the proteolytic and lipolytic activities of the microbial flora isolated from raw, refrigerated, type B milk. II. Psychrotrophic microorganisms. **Rev. Latinoam Microbiol.**, v. 41, p. 85-89, 1999.

STICKLER, D. Biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 2, p. 270-275, 1999.

STONE, L. S.; ZOTTOLA, E. A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 951-956, 1985.

SUTHERLAND, A.D. Toxin production by *Bacillus cereus* in dairy products. **Journal of Dairy Research**, London, v. 60, n. 4, p. 569-574, 1993.

TROLLER, J.A. **Sanitation in food processing**. 2. ed. New York: Academic Press, 1993. cap 5, p. 52-69.

VAN OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hidroplilicity and hidrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VERUS MADASA. **Ribotipagem automatizada no Brasil!** Disponível em: <http://www.madasa.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=84&Itemid=159&lang=pt_br>. Acesso em: 14 maio 2007.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WALKER, N. J. A technique whose time has come. **Science**, v. 296, 19 abr. 2002.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

WONG, H. C.; CHANG, M. H.; FAN, J. Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* Isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 699-702, 1998.

ZACARCHENCO, P. B.; LEITÃO, M. F. F.; DESTRO, M. T. et al. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. **Ciên. Tecnol. Aliment.**, v. 20, p. 363-368, 2000.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing – should they be a concern? **Int. J. Food Micro.**, v. 23, p. 125-148, 1994.

APÉNDICE

APÊNDICE

Resumo da análise de variância das cargas elétricas superficiais relativas (% de UFC de *B. cereus* adsorvida nas resinas de troca iônica) de diferentes ribogrupos, analisados em resinas catiônica e aniônica

FV	GL	SQ	QM	F	Signif.
Resina	1	190,2092	190,2092	28,147*	0,0001
Ribogrupo	6	63,54513	10,59086	1,567	0,19353
Resina x Ribogrupo	6	64,23765	10,70627	1,584	0,18865
Resíduo	28	189,2166	6,757736		
Total	41	507,20858			

Coeficiente de variação = 2.664

* Significativo a 5% de significância, pelo teste F.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)