

MARIA APARECIDA ANTUNES

**CONTAMINAÇÃO, CRESCIMENTO E INATIVAÇÃO DE  
MICRORGANISMOS NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE ALFACE (*Lactuca  
sativa L.*) VARIEDADE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

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  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



MARIA APARECIDA ANTUNES

**CONTAMINAÇÃO, CRESCIMENTO E INATIVAÇÃO DE  
MICRORGANISMOS NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE ALFACE (*Lactuca  
sativa L.*) VARIEDADE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

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: 05 de agosto de 2009.

---

Prof. José Benício Paes Chaves  
(Coorientador)

---

Prof. Luis Antonio Minim  
(Coorientador)

---

Prof. Wilmer Edgard Luera Peña

---

Pesq. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

---

Prof. Nélio José de Andrade  
(Orientador)

*“O saber, tal como o amor do próximo, é algo que se torna cada vez maior quando se divide, pois aqui a divisão é sinônimo de partilha”.*

Anônimo

Ao professor Nélio, pelos ensinamentos.

Ao meu marido Alessandro, pelo amor.

Ao meu filho Lucas, pela emoção e esperança.

Dedico.

A Deus, ofereço.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, pelas muitas oportunidades concedidas.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Nélio, a quem admiro como professor e como pessoa, pelos ensinamentos, orientação, oportunidades concedidas e amizade. Sinceramente, não tenho palavras bastantes para agradecer.

Ao professor José Benício Paes Chaves, pelos ensinamentos, incentivo, valorização e pela constante ajuda ao longo do curso.

Ao professor Wilmer Edgard, pela orientação, generosa colaboração e sugestões valiosas.

A professora Regina Célia Santos Mendonça, pelos ensinamentos e disposição em ajudar.

Ao professor Afonso, pelos ensinamentos e colaboração durante a realização dos experimentos.

À professora Edmar Aparecida Filomeno, pela ajuda com o projeto.

À Dr<sup>a</sup> Cláudia Alencar Vanetti, do Núcleo de Microscopia e Microanálise, pela atenção, auxílio com as técnicas utilizadas e ensinamentos.

À professora Nilda e ao pessoal do laboratório de embalagens, pelo apoio, concessão de espaço, material e outros.

À Dr<sup>a</sup> Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pela participação na banca examinadora, sugestões para a tese e amizade.

A todos os professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos e amizade.

À Maria Geralda, pela amizade, apoio e convivência durante todos esses anos.

Aos alunos da iniciação científica, especialmente agradeço Robertta Vidigal, Sílvia Domingues, Daniela Lana, Daniela Leocádio, Daniela Colombari e Keyla. Sem o esforço delas este trabalho não seria realizado.

Aos colegas de laboratório e aos colegas da pós-graduação, pela troca de conhecimentos.

Aos laboratoristas que me auxiliaram, especialmente Pio e Thiago.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela amizade e também pelos serviços prestados.

À coordenadora da VISA de Viçosa, Sr<sup>a</sup> Elge de Azevedo Magalhães Fialho, que possibilitou que eu realizasse o trabalho com os restaurantes de Viçosa.

Ao pessoal da Emater, pelas informações sobre a produção de hortaliças no município de Viçosa.

Aos proprietários e colaboradores dos restaurantes e, aos produtores rurais, que gentilmente disponibilizaram seus estabelecimentos e permitiram as coletas de dados e de materiais.

Aos professores e coordenadores do Laboratório de Desenvolvimento Infantil e Humano, pela dedicação, competência e seriedade com que cuidam das crianças, inclusive do meu filho Lucas.

Aos meus pais, sempre presentes, pelos ensinamentos para a vida.

À minha família, pelo apoio incondicional e pela grande torcida.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.



## **BIOGRAFIA**

MARIA APARECIDA ANTUNES, filha de José Antunes Coura (*in memoriam*) e Maria Inês Antunes (*in memoriam*), nasceu em Dionísio, Estado de Minas Gerais, em 28 de setembro de 1967.

Em janeiro de 1994, graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa.

Foi contratada, em outubro de 1994, como nutricionista da HM Madeira, empresa de refeições coletivas situada na cidade de Vitória, Espírito Santo. No período de fevereiro de 1995 a julho de 2001 foi contratada como nutricionista pela CAIPA (Comercial e Agrícola Ipatinga Ltda.). Nesta empresa atuou como responsável por atividades de planejamento e produção de refeições, manutenção do Sistema de Qualidade ISO 9002 e APPCC, treinamento de empregados na unidade matriz da empresa, englobando 23 restaurantes de área e uma produção de 12.000 refeições/dia.

Em agosto de 2001 iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de mestre em agosto de 2003.

Iniciou, em agosto do mesmo ano, o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na mesma instituição, concluindo-o em 5 de agosto de 2009.

## ÍNDICE

LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT .....	xx
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. A alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	3
2.2. O paradoxo do consumo de hortaliças frescas e implicações na saúde humana .	4
2.3. Tratamentos para redução da microbiota em hortaliças consumidas cruas.....	7
2.4. Resposta das enterobactérias ao estresse ácido .....	13
2.5. O setor de refeições e segurança alimentar .....	15
2.6. O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle.....	17
2.7. Desenvolvimento de um plano APPCC .....	18
2.8. Realização da análise de perigos.....	22
2.9. Modelos matemáticos da microbiologia preditiva .....	24
2.10. Estudos de modelos da microbiologia preditiva.....	32
2.11. Análise quantitativa do risco.....	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1. Caracterização da superfície da alface .....	53
3.2. Avaliação dos hábitos de consumo da população usuária dos restaurantes .....	56
3.3. Avaliação das condições higiênicas do processamento nos restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, MG .....	57
3.4. Microbiota da alface do campo à mesa .....	60
3.5. Determinação da concentração do princípio ativo das soluções sanitizantes utilizados nos restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, MG .....	66

3.6. Testes do desafio microbiológico .....	67
3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos da inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida à folha de alface Vitória de Santo Antão.....	72
3.8. Tempo de adaptação e crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em alface Vitória de Santo Antão .....	75
3.9. Avaliação quantitativa do provável consumo da bactéria <i>K. pneumoniae</i> veiculada pela alface preparada nos restaurantes comerciais de Viçosa, MG .....	81
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
4.1. Caracterização da superfície foliar por microscopia eletrônica de varredura .....	82
4.2. Caracterização dos usuários e hábitos de consumo de alface nos restaurantes comerciais.....	88
4.3. Condições higiênicas de processamento em restaurantes comerciais .....	96
4.4. Avaliação da microbiota da alface .....	106
4.5. Testes-desafio a agentes antimicrobianos .....	119
4.6. Cinética de inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com soluções sanitizantes preparadas a partir de cloramina orgânica e de vinagre comercial .....	124
4.7. Modelagem de crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em folhas de alface .....	135
4.8. Avaliação da exposição à <i>Klebsiella pneumoniae</i> em restaurantes comerciais através do consumo da alface .....	144
5. CONCLUSÕES .....	148
6. REFERÊNCIAS.....	150
ANEXO 1 - Análises estatísticas do teste de suspensão realizado para determinar as reduções decimais de <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> após exposição a soluções de vinagre acrescentadas ou não de cloreto de sódio.....	171
ANEXO 2 - Análises estatísticas do teste da adesão de <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> em alface tratadas com água, cloramina orgânica, ácido acético 1,5% e ácido e acético 1,5% e cloreto de sódio 0,5%. .....	173
Anexo 3 - Análises estatísticas sobre a avaliação da resistência das enterobactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderidas à folha de alface em relação aos tratamentos com água, cloramina orgânica, ácido acético 1,5% e ácido e acético 1,5% e cloreto de sódio 0,5%.....	175

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sigla dos testes bioquímicos, enzimas e reações do sistema de identificação de enterobactérias API 20E .....	64
Quadro 2 - Enterobactérias que causaram doenças de origem alimentar de etiologia conhecida informadas na literatura .....	113
Quadro 3 - Equações ajustadas nos diversos modelos para predição da taxa específica de crescimento máximo pelo efeito da temperatura.....	141

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontos críticos de controle, critérios para produção segura de alimentos e porcentagem em conformidade .....	15
Tabela 2 - Variação das contagens, médias ( $\bar{x}$ ) e desvios-padrão das médias (s) dos logaritmos de células de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 inoculadas e aderidas nas superfícies e nas beiradas cortadas nos cupons de alface Vitória de Santo Antão .....	84
Tabela 3 - Logaritmo das contagens dos microrganismos das amostras de alface Vitória de Santo Antão coletadas no campo, no momento da entrega nos restaurantes e após o preparo para consumo.....	106
Tabela 4 - Temperaturas mínimas e máximas registradas no processamento da alface no período de maio a agosto de 2006.....	109
Tabela 5 - Gêneros e espécies de bactérias Gram-negativas identificadas pelo sistema API20E .....	110
Tabela 6 - Prevalência das enterobactérias nas três etapas da cadeia de produção da alface Vitória de Santo Antão.....	112
Tabela 7 - Incidência dos microrganismos potencialmente perigosos ao longo da cadeia de produção.....	117
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica (170 mg·L <sup>-1</sup> CRT, pH 6,2, 22 °C) .....	126
Tabela 9 - Valores dos índices estatísticos para o modelo de dois termos aplicado às curvas de inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica (170 mg·L <sup>-1</sup> CRT, pH 6,2, 22 °C) .....	127
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica (170 mg·L <sup>-1</sup> CRT, pH 6,0, 22 °C).....	129

Tabela 11 - Valores dos índices estatísticos para o modelo de dois termos aplicado às curvas de inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica (170 mg·L <sup>-1</sup> CRT, pH 6,0, 22 °C) .....	130
Tabela 12 - Parâmetros cinéticos de inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida em folha de alface tratada com ácido acético (0,18% HAc, pH 2,8, 60 min) .....	132
Tabela 13 - Valores dos índices estatísticos para o modelo de dois termos aplicado às curvas de inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com solução de ácido acético (0,18%, pH 2,8, 22 °C) .....	134
Tabela 14 - Parâmetros cinéticos do crescimento de <i>Klebsiella penumonineae</i> na alface Vitória de Santo Antão obtidos pelo modelo de Baranyi e Roberts .....	137
Tabela 15 - Valores dos índices estatísticos para os modelos secundários Arrhenius e de Weibull em descrever a duração da fase lag em função da temperatura .....	140
Tabela 16 - Valores dos índices estatísticos para os modelos secundários: Modelo de Ratkowsky, Modelo de Ratkowsky modificado, Modelo Arrhenius e Modelo de Weibull	143
Tabela 17 - Prevalência e log UFC·g <sup>-1</sup> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em 27 amostras em cada estágio da cadeia de produção da alface Vitória de Santo Antão, desde a produção primária até a mesa do consumidor, em razão do processo, tempo e temperatura .....	146
Tabela 18 - Valores observados e valores preditos da concentração de células de <i>Klebsiella pneumoniae</i> na alface ao ponto de consumo a 20 °C após 1 h, 2 h, 3 h e 4 h após preparo .....	147
Tabela 19 - ANOVA das reduções decimais nas populações de <i>Escherichia coli</i> após tratamentos com soluções de ácido acético e cloreto e sódio.....	171
Tabela 20 - ANOVA das médias das contagens da população de <i>Cronobacter sakazakii</i> sobrevivente aos seis tratamentos.....	171
Tabela 21 - Teste de Tukey para os tratamentos <i>Cronobacter sakazakii</i> . .....	171
Tabela 22 - ANOVA para experimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	172
Tabela 23 - Teste de Tukey para os tratamentos <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	172
Tabela 24 - ANOVA das reduções decimais das populações de <i>Escherichia coli</i> após os tratamentos.....	173
Tabela 25 - Teste de Tukey para os tratamentos <i>Escherichia coli</i> . .....	173
Tabela 26 - ANOVA para experimento de <i>Cronobacter sakazakii</i> . .....	173
Tabela 27 - Teste de Tukey para os tratamentos <i>Cronobacter sakazakii</i> . .....	174

Tabela 28 - ANOVA para experimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	174
Tabela 29 - Reduções decimais após os tratamentos das folhas de alface artificialmente com <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	174
Tabela 30 - ANOVA das reduções decimais das populações de <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> após tratamento com água. ....	175
Tabela 31 - ANOVA das reduções decimais das populações de <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> após tratamento com cloramina orgânica. ....	175
Tabela 32 - ANOVA das reduções decimais das populações de <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> pela ação do ácido acético 1,5%. ....	175
Tabela 33 - ANOVA das reduções decimais das populações de <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> pela ação do ácido acético 1,5% e cloreto de sódio 0,5%. ....	176

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição por faixa etária dos casos notificados de doenças diarreicas agudas no ano de 2005 registrados no município de Viçosa, MG.....	7
Figura 2 - Conceito do sistema APPCC com os seus sete princípios e uma proposta para estabelecimento de critérios para perigos microbiológicos associados a doenças de origem alimentar (NOTERMANS et al., 1995).....	19
Figura 3 - A curva típica de crescimento microbiológico (ZWITERING, 1990).....	27
Figura 4 - Condições intra e extracelulares de uma célula, $z(t)$ e $c(t)$ , afetando mutuamente umas as outras. A taxa delas está descrita pelas funções $f(z, c)$ e $g(z, c)$ . Os parâmetros dependem do atual estado das condições externas, envolvidas em $D(t)$ , que não são afetados pelo metabolismo bacteriano. Durante uma curva de crescimento típica, aumenta durante a fase lag e $c(t)$ deteriora na fase estacionária.....	37
Figura 5 - Estrutura da análise de risco (SCHOTHORST, 2002).....	49
Figura 6 - Representação esquemática dos passos da avaliação do risco (SCHOTHORST, 2002). .....	50
Figura 7 - Fluxograma da análise de perigos para auxílio na classificação de microrganismos potencialmente perigosos (NOTERMANS, 1994).....	65
Figura 8 - Fotomicrografias da superfície foliar da alface Vitória de Santo Antão. A) Vista geral da superfície abaxial com células epiteliais, um estômato e ceras epicuticulares; B) Detalhe de um estômato recoberto de ceras; C) Detalhe da rugosidade da superfície e um tricoma; D) Detalhe da borda intacta natural da beirada da folha de alface. A e B são superfícies sanitizadas e C e D são superfícies somente lavadas. ....	83
Figura 9 - Fotomicrografias dos sítios de adesão de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e da microbiota natural na superfície foliar da alface Vitória de Santo Antão. A) Células de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 colonizadas em estômatos e em lesões; B) Microbiota natural	



da alface colonizada no estômato; C) Adesão de células de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ao longo da nervura; e D) Aglomerados de células de <i>E. coli</i> O157:H7, colonização de estômatos e adesão em dobraduras na superfície irregular.....	85
Figura 10 - Fotomicrografias das bordas dos cortes de 1 mm de cupons das superfícies foliares de alface Vitória de Santo Antão aderidas com <i>Escherichia coli</i> O157:H7. A) Visão global; B) Visão lateral com células de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 aderidas à superfície; C) Cobertura de células por toda extensão da borda cortada; e D) Borda cortada sem adesão. ....	86
Figura 11 - Percentual de usuários dos restaurantes comerciais, classificados por sexo.	89
Figura 12 - Distribuição em porcentagens de usuários dos restaurantes comerciais classificados por sexo e idade. ....	89
Figura 13 - Tamanho da porção de alface consumida por usuários dos restaurantes comerciais em razão do sexo. ....	90
Figura 14 - Interação entre a frequência de consumo de alface nos restaurantes comerciais e tamanho da porção consumida.....	91
Figura 15 - Distribuição da frequência do consumo da alface por homens e mulheres nos restaurantes comerciais.....	92
Figura 16 - Consumo da alface pelos usuários dos restaurantes comerciais por semana versus idade dos usuários. ....	92
Figura 17 - Hábito de lavar entre os usuários dos restaurantes comerciais. ....	94
Figura 18 - Frequência da ocorrência de diarreia dentre os usuários dos restaurantes comerciais. ....	95
Figura 19 - Relação entre frequência de usuários de restaurantes comerciais e ocorrência de diarreia.....	96
Figura 20 - Médias das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras obtidos pela técnica da sedimentação simples, expressadas em $\log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$ , do ar dos ambientes não refrigerados dos restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, MG. As barras representam o desvio-padrão da média. ....	97
Figura 21 - Médias e desvios-padrão das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras obtidos pela técnica da sedimentação simples e expressados em $\log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$ do ar dos ambientes refrigerados dos	

restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, MG. As barras representam o desvio-padrão da média.....	99
Figura 22 - Médias e desvios-padrão das contagens de coliformes e de mesófilos aeróbios obtidos pela técnica do <i>swab</i> e expressados em log UFC/mão de mãos de manipuladores de salada de sete restaurantes comerciais de Viçosa, MG. As barras representam o desvio-padrão da média.....	100
Figura 23 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de bacias utilizadas no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.....	102
Figura 24 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de tabuas utilizadas no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.....	103
Figura 25 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de facas utilizadas no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.....	104
Figura 26 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de escorredores utilizados no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.....	104
Figura 27 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de cubas utilizadas no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.....	105
Figura 28 - Reduções decimais em populações de células planctônicas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> , após exposição a soluções de vinagre acrescentadas ou não de cloreto de sódio, realizadas pelo teste da suspensão. As barras representam os desvios-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey. ....	120
Figura 29 - Reduções decimais em populações de <i>Escherichia coli</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderidas em folha de alface devido à ação da água e de sanitizantes químicos. As barras representam o desvio-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). ....	123
Figura 30 - Curva de sobrevivência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica ( $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CRT, pH 6,2, 22 °C). Os pontos plotados são os valores médios de quatro observações. As barras verticais representam os desvios-padrão da média. A linha é a curva predita baseada no ajuste dos dados com a Equação 51 usando-se regressão não linear.....	125
Figura 31 - Curva de inativação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida à folha de alface tratada com cloramina orgânica ( $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6,0, 22 °C). Os pontos plotados são valores médios de quatro observações. As barras verticais representam os desvios-	

padrão da média. A linha é a curva predita com base no ajuste dos dados com a Equação 51 usando-se regressão não linear.....	128
Figura 32 - Curvas de sobreviventes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aderida à folha de alface tratada com com ácido acético (0,18%, pH 2,8, 22 °C).Os pontos plotados são valores médios de quatro observações. As barras verticais representam o desvio-padrão da média. A linha representa a curva predita com base no ajuste dos dados pela Equação 51, usando-se regressão não linear.....	132
Figura 33 - Comportamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> na alface Vitória de Santo Antão armazenada nas temperaturas de 5 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C e 40 °C. As linhas contínuas representam o ajuste com o modelo de Baranyi e Roberts e, as pontilhadas, o ajuste com o modelo de Gompertz aos logaritmos das contagens, usando-se o DMFit. As populações informadas representam as médias das repetições dos ensaios, e as barras, apresentam o desvio-padrão da média.....	136
Figura 34 - Efeito da temperatura na duração da fase lag descrita pelos modelos Arrhenius e Weibull para os cultivos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em alface armazenada nas temperaturas de 5 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C e 40 °C.....	140
Figura 35 - Efeito da temperatura na taxa específica máxima de crescimento $\mu_{max}$ , ajustados com os modelos Ratkowsky, Ratkowsky modificado, Linear e Weibull. ....	142

## RESUMO

ANTUNES, Maria Aparecida, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2009. **Contaminação, crescimento e inativação de microrganismos na cadeia de produção de alface (*Lactuca sativa* L.) variedade Vitória de Santo Antão.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadores: José Benício Paes Chaves, Luis Antonio Minim e Regina Célia Santos Mendonça.

Foi analisada a cadeia de produção da alface, cultivar Vitória de Santo Antão, do campo à mesa, sob as diretrizes do sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e do sistema de Análise de Risco Microbiológico. Para este estudo realizaram-se as etapas: caracterização da superfície foliar da alface; avaliação dos hábitos de consumo da alface e condições de higiene do processamento em restaurantes comerciais; avaliação da contaminação da alface do campo à mesa; identificação, listagem e análise de potenciais perigos das enterobactérias encontradas; testes de desafio microbiológico e testes de armazenamento utilizando-se modelos da microbiologia preditiva; e, finalmente, uma avaliação de riscos microbiológicos. Inicialmente, caracterizou-se a superfície foliar por microscopia eletrônica de varredura. A cutícula apresentou-se hidrofóbica e irregular. Estômatos e nervuras foram sítios naturais de adesão *E. coli* O157:H7, além das superfícies hidrofílicas de lesões cuticulares e de cortes. A adesão intencional desse microrganismo nas bordas e cortes na folha de alface foi superior a  $5 \log\text{-cm}^{-2}$ . Avaliaram-se os hábitos de consumo de alface em restaurantes comerciais. Porções pequenas (8,0 g), médias (20 g) e grandes (30 g) são consumidas diariamente por pessoas entre 10 e mais de 40 anos, de ambos os sexos. Afirmaram que não lava as mãos antes das refeições 16,0% dos homens e 11,3% das mulheres. Dentre os usuários dos restaurantes, 10,1% afirmaram que tiveram diarreia. O número de casos de diarreia foi maior entre os usuários assíduos aos restaurantes do que os esporádicos. Avaliaram-se as condições higiênicas de sete restaurantes comerciais de Viçosa, MG. Na avaliação do ar dos ambientes refrigerados e não refrigerados, de modo geral, as contaminações estavam acima das recomendações da APHA e de pesquisadores

brasileiros. As mãos dos manipuladores em cinco restaurantes apresentaram médias de contagens superiores a 2 log UFC/mão para coliformes e mesófilos aeróbios. Todos os utensílios apresentaram contagens de mesófilos aeróbios acima das recomendações da APHA (0,30 log UFC·cm<sup>-2</sup>) e poucos atenderam às recomendações mais flexíveis (1,70 log UFC·cm<sup>-2</sup>). Avaliou-se quantitativamente a contaminação da alface campo à mesa. A contaminação por coliformes, enterobactérias e fungos e leveduras foi constatada em todas as etapas, no campo, na entrega e na fase de consumo. Não houve incidência de *E. coli* nas amostras coletadas no campo. Mas, a bactéria estava presente nas amostras para a entrega e prontas para o consumo, indicando que houve contaminação ao longo do processo. Observou-se que não houve reduções dos microrganismos contaminantes ao longo da cadeia de produção. Em alguns casos, houve aumento da contaminação. Foram isoladas bactérias Gram-negativas presentes nas etapas “campo”, “entrega” e “pronta para consumo” e dezoito delas foram identificadas por microscopia e provas bioquímicas. As enterobactérias foram listadas e realizou-se a análise de perigos segundo metodologia APPCC. Consideraram-se como perigos potenciais *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e, predominantemente, *Klebsiella pneumoniae*, com prevalência em 81,5% nas amostras de alface prontas para consumo nos restaurantes. Esses microrganismos foram submetidos aos testes de desafio microbiológico e de armazenamento. Em um dos desafios, avaliou-se, pelo teste da suspensão, a eficácia de soluções de vinagre (ácido acético) acrescentada de cloreto de sódio ou não para a inativação de células planctônicas dos três gêneros. As soluções foram eficientes em reduzir populações de *C. sakazakii* e de *K. pneumoniae*. Mas, estas soluções não foram aprovadas pelo teste da suspensão. Em outro desafio, avaliou-se a eficácia da água, solução de cloramina orgânica e soluções de ácido acético, acrescentadas ou não de cloreto de sódio, para reduzir as bactérias aderidas às folhas de alface. Observou-se a ação sinérgica do cloreto de sódio adicionado ao ácido acético em inativar *C. sakazakii* e *K. pneumoniae*. As reduções decimais foram iguais às com cloramina orgânica. Não houve, porém, diferença na resistência das enterobactérias em relação ao tratamento. No entanto, nenhuma solução sanitizante atingiu reduções decimais de três ciclos logarítmicos na população de microrganismos, como recomendado para células sésseis. Avaliou-se, também, a eficácia de uma solução de cloramina orgânica e outra de ácido acético em inativar células de *K. pneumoniae* aderidas à folha de alface, nas concentrações usadas pelos restaurantes. O modelo exponencial de dois termos foi apropriado para descrever a cinética de inativação. Nas populações estudadas, duas subpopulações de resistência heterogênea foram identificadas, uma mais sensível e outra mais resistente. Do ajuste das curvas de inativação obtiveram-se as constantes de velocidade de inativação das duas subpopulações. Nos testes de

armazenamento, estudou-se o crescimento de *K. pneumoniae* na alface mediante temperaturas entre 5 e 40 °C. Os modelos matemáticos primários da microbiologia preditiva, Gompertz modificado e de Baranyi e Roberts, foram utilizados para descrever as curvas de crescimento. Verificou-se que o modelo Baranyi e Roberts foi o mais adequado às respostas do crescimento microbiano. Na temperatura de distribuição observada nos restaurantes de 20 °C, o tempo da adaptação ( $\lambda$ ) foi de 1,74 h, e a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) de 0,199·h<sup>-1</sup>. Observou-se, também, que *K. pneumoniae* cresceu sob refrigeração em temperatura de 5 °C. No estudo dos parâmetros de crescimento por modelos secundários, os modelos de Arrhenius e de Weibull ajustaram-se bem aos dados da duração da fase lag, e o modelo simples de raiz quadrada de Ratkowsky descreveu bem o efeito da temperatura sobre as taxas específicas de crescimento máximo. A análise de risco microbiológico nesse experimento, considerando a prevalência e o número de *K. pneumoniae* nas amostras em cada estágio da cadeia de produção da alface Vitória de Santo Antão, desde a primária até a mesa do consumidor, em razão do processo, da temperatura e do tempo de exposição, indicou riscos de o consumidor ingerir grande número de células do microrganismo.

## ABSTRACT

ANTUNES, Maria Aparecida, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2009. **Contamination, growth and inactivation of microorganisms in the production of lettuce (*Lactuca sativa* L.) variety Vitória de Santo Antão.** Adviser: Nélcio José de Andrade. Co-Advisers: José Benício Paes Chaves, Luis Antonio Minim and Regina Célia Santos Mendonça.

The production chain from farm to table of the lettuce Vitória de Santo Antão was analyzed under the guidelines of the Hazard Analysis Critical Control Point system (HACCP) and Risk Assessment of microbiological hazards system. The following stages were realized for this study: lettuce foliar surface characterization, evaluation of lettuce consumption habits and hygiene conditions of the processing in commercial restaurants, evaluation of lettuce contamination from the farm to table, identification, listing and analysis of potential hazard in a food operations; microbiological challenge tests and storage tests using predictive microbiology; and, finally, an evaluation of microbiological risks. First, the foliar surface was characterized by electronic microscopy. Cuticle showed being hydrophobic and uneven. Stomata and ribbings had been natural adhesion sites. *E. coli* O157: H7 beyond the hydrophilic surfaces of injuries cuticule and cuts. The intentional microorganism adhesion in the edges and cuts in the lettuce leaf reached > 5 log. The consumption habits of lettuce in commercial restaurants had been evaluated. Small (8 g), midle (20 g) and great portions (30 g) are daily consumed by people between 10 and 40 years old, both male and female. Affirmed that do not wash the hands before meals 16.0% of the men and 11.3% of the women had. Among the restaurants consumers, 10.1% had affirmed they had diarrhea recently. The number of diarrhea cases was greater among people that frequently eat at restaurants than among the ones who sporadically eat at restaurants. The hygienical conditions of seven commercial restaurants in Viçosa, MG were evaluated. The contaminations were above of the recommendations of the APHA and Brazilian researchers in the evaluation of the air of cooled and not cooled environments. The manipulators hands in five restaurants had presented averages of

counting  $> 2 \log$  CFU/hand for total coliforms and aerobic mesophilic organisms. All the utensils had presented counting of aerobic mesophilic above of the recommendations of APHA ( $0.30 \log$  CFU·cm<sup>-2</sup>) and few had taken care of to the recommendations most flexible ( $1.70 \log$  CFU·cm<sup>-2</sup>). The contamination of the lettuce was evaluated quantitatively from the farm to table. Total coliforms, enterobacterias and filamentous molds and yeast had been present in all evaluated stages (in the farm, in the delivery and ready to eat). There was no *E. coli* incidence in the farm samples, but there was in the delivery samples and ready for consumption, indicating that it was spread throughout the process. It was observed that there were no satisfactory reductions of contaminants microorganisms throughout the production chain. In some cases, it increased instead of reducing. Gram-negative bacteria present in the stages “farm”, “delivery” and “ready to eat” were isolated and 18 were identified by microscopy and biochemical tests. The enterobacterias were listed and the hazards analysis of the potentially hazardous microorganisms was realized by HACCP methodology. The following were considered as potentially hazardous microorganisms: *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* and *Klebsiella pneumoniae*. The prevalence of this last one was 81.5% in the samples of lettuce ready to eat in the restaurants. These microorganisms were submitted to microbiological challenge tests and storage tests. In one of the challenges, by the suspension test, the efficacy of acetic acid (vinegar) added or not to sodium chloride in the inactivation of planktonic cells of the three enterobacterias was evaluated. The solutions were efficient in reducing populations of *C. sakazakii* and *K. pneumoniae*. However, the solutions had not been approved by the test of the suspension. In another challenge, the efficacy of the water, solution of chloramine organic and solutions of acetic acid, added or not to sodium chloride, in reducing the bacteria attached to lettuce leaves were evaluated. The synergic action of the sodium chloride added to the acetic acid was observed in the *C. sakazakii* e *K. pneumoniae* inactivation. The decimal reductions were equal to the reductions with chloramine organic. There was no difference in the endobacterias resistance in relation to the treatment also. However, no sanitizer solution reached 3 decimal reduction values in the microorganism population, as recommended for sessile cells. The effectiveness of one solution of chloramine organic and one of acetic acid, in the concentrations used by the restaurants, was evaluated in inactivating *K. pneumoniae* attached to the lettuce leaf. The results were analyzed by two term exponential model for mixed cell population to the adjustment of inactivation curves and to obtain the constants of inactivation. In the storage tests, the increasing of *K. pneumoniae* in the lettuce in temperatures between 5 and 40 °C was studied. Two primary models of the predictive microbiology, modified Gompertz and Baranyi and Roberts, had been used to describe the growth curves. It was verified that the model Baranyi and Roberts was more adjusted to the answers of the microbial growth,



obtaining the values of the main parameters of the microbial growth. In the temperature of distribution that occurs in the restaurants, 20 °C, the adaptation time ( $\lambda$ ) was 1.74 h, and the specific rate of growth ( $\mu_{\max}$ ) 0.199·h<sup>-1</sup>. Besides, it was observed that *K. pneumoniae* grew at 5° C under the parameters of growth for secondary models. The Weibull model adjusted well to the data of the duration of the lag phase and simple square root model of Ratkowsky described the effect of temperature on the maximum growth rate. The analysis of microbiological risk in this experiment, considering the prevalence and the number of *Klebsiella pneumoniae* samples in each stage of the production chain of the lettuce Vitória de Santo Antão, since the primary production until the consumer's table, in reason of the process, the temperature and the time, indicated the risk for consumers of ingesting high number of microorganisms.

## 1. INTRODUÇÃO

As hortaliças frescas, por exemplo, a alface, fazem parte de uma cadeia complexa, em que o último elo é o consumidor. A produção agrícola é um importante nicho na economia, fator de agregação do homem ao campo, permitindo o acesso a alimentos de efeitos benéficos à saúde. Além do consumo doméstico, as hortaliças frescas são servidas em restaurantes de auto-serviço em esquemas de bufês de salada. Apesar de se destacarem pelas propriedades nutricionais, as hortaliças podem veicular perigos e seu consumo pode representar riscos microbiológicos à saúde dos consumidores. Portanto, é de fundamental importância que os produtores de alimentos tornem-se familiarizados com as ferramentas que permitem manipular os elementos do processamento e da distribuição, de maneira que os riscos de efeitos adversos à saúde possam ser minimizados.

Para reduzir os riscos da ocorrência de doenças de origem alimentar, a contaminação dos alimentos deve ser prevenida ao longo de todo o processo, desde o campo até o momento de seu consumo. Há necessidade de compreender o comportamento dos microrganismos potencialmente perigosos presentes no alimento durante as etapas de processamento e prever os resultados dos possíveis abusos para a segurança do produto final. Testes de desafio microbiológico e modelagem preditiva permitem a geração de informações para propósitos de segurança alimentar. Eles auxiliam na determinação de passos críticos do processo em que medidas de controle podem ser tomadas e, conseqüentemente, apresentar melhoria do processo, em uma abordagem quantitativa do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Para a gestão dos riscos associados ao consumo de hortaliças cruas contaminadas em restaurantes comerciais, os produtores rurais, assim como os manipuladores de alimentos, precisam de informações. Devem compreender que os perigos microbiológicos podem ser influenciados por práticas agrônômicas, etapas do

processamento e modo de preparo para o consumo. Portanto, deve ser empreendida a avaliação quantitativa do risco de infecções humanas que pode estar ligado ao consumo de hortaliças contaminadas.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as condições higiênicas da cadeia de produção da alface Vitória de Santo Antão para determinar a segurança microbiológica deste alimento durante a sua distribuição em restaurantes comerciais.

Como objetivos específicos deste trabalho pretenderam-se:

- a) Caracterizar microscopicamente a superfície foliar da alface.
- b) Observar sítios de adesão bacteriana na superfície abaxial e adaxial da folha de alface.
- c) Comparar adesão de *Escherichia coli* O157:H7 nas extremidades cortadas e porções internas das amostras da folha de alface.
- d) Avaliar as condições higiênicas do ar de ambientes de processamento em restaurantes industriais.
- e) Avaliar as condições higiênicas de manipuladores responsáveis pelo preparo de saladas em restaurantes comerciais.
- f) Avaliar as condições higiênicas de equipamentos e de utensílios no preparo de saladas em restaurantes comerciais.
- g) Determinar a microbiota em amostras de alface coletadas no campo, no momento da entrega nos restaurantes e após o preparo para o consumo.
- h) Identificar enterobactérias em amostras de alfaces coletadas no campo, no momento da entrega nos restaurantes e após o preparo para o consumo.
- i) Determinar as concentrações das soluções sanitizantes usadas nos restaurantes comerciais.
- j) Avaliar a atividade bactericida de diferentes soluções de vinagre acrescidas de cloreto de sódio sobre células planctônicas de *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* isolados de alface.
- k) Determinar a eficiência de uma cloramina orgânica e de vinagre em inativar células de *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* aderidas em folhas de alface.
- l) Determinar a cinética de morte celular com uma cloramina orgânica e com solução diluída de vinagre.
- m) Determinar os parâmetros cinéticos de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em folha de alface Vitória de Santo Antão.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1.A alface (*Lactuca sativa* L.)

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertencente à família *Asteraceae*, possui folhas lisas ou crespas, dispostas em forma de roseta partindo-se de um caule muito pequeno, não ramificado a qual se prendem folhas de coloração que varia do verde-amarelado até o verde-escuro. Esta planta é originária do Mediterrâneo sendo introduzida no Brasil pelos portugueses. Nas regiões de clima tropical e subtropical desenvolve-se melhor durante estações do ano em que as temperaturas são mais amenas, entre 15 °C e 20 °C, para o crescimento vegetativo (FILGUEIRA, 2000).

Existem cultivares que produzem bem no verão. No Brasil, a produção de alface nas estações quentes foi viabilizada em virtude do melhoramento genético. Tornou-se possível o cultivo em temperaturas mais elevadas, com fotoperíodo mais longo, sem estimular o pendoamento, sem alterar o sabor original e com maior resistência ao vírus do mosaico da alface (NAGAI, 1980).

Um exemplo desse tipo é a alface Vitória de Santo Antão, do tipo manteiga, que foi desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) como uma variedade a ser cultivada em regiões tropicais. É uma planta muito vigorosa, com folhas grossas formando cabeça, tolerante ao calor e ao pendoamento precoce. Mas, mesmo com os esforços do melhoramento genético, a produção de alface em estações quentes, em grande parte do território brasileiro, é ainda problemática uma vez que há escassez e má qualidade do produto. A utilização de estufas soluciona parcialmente os problemas climáticos, como o excesso de chuvas. O uso de coberturas plásticas pode levar ao aquecimento excessivo quando as estufas são maldimensionadas ou manejadas incorretamente (VIGGIANO, 1990).

A alface, pela sua adaptação às condições climáticas diversas, possibilita cultivos sucessivos no mesmo ano. É a hortaliça folhosa de maior valor comercial no Brasil. Possui cerca de setenta cultivares e, aproximadamente, 18 são nacionais. São

cultivados, principalmente, para consumo de suas folhas cruas em saladas. As regiões Sul e Sudeste do Brasil são as principais consumidoras da hortaliça (VIGGIANO, 1990).

A hortaliça é produzida em cinturões verdes próximos a grandes centros consumidores. Devido ao seu alto teor de água e grande área foliar, é muito perecível no período pós-colheita. O processo de senescência de folhosas ocorre principalmente por causa da rápida perda de água e da ação de microrganismos e de enzimas catalíticas. A colheita interrompe o fornecimento de água e ocorre subsequente perda de água pela transpiração. A perda de água pode acelerar a deterioração pelo aumento da taxa de algumas reações de origem catabólica, como a degradação da clorofila. A redução da temperatura aumenta a conservação pós-colheita dos folhosos por diminuir a pressão de vapor entre a planta e o meio, reduzindo a perda de água (FINGER; VIEIRA, 1997).

A alface é cultivada em regiões temperadas e tropicais e é exigente nas características físicas e químicas do solo. Por ser de ciclo curto, responde ao fornecimento de nitrogênio em sua nutrição. O solo ideal para seu cultivo é areno-argiloso rico em matéria orgânica (FILGUEIRA, 2000). A adubação com esterco de animais e compostos orgânicos tem sido amplamente utilizada na produção de alface, com o objetivo de reduzir as quantidades de fertilizantes químicos e melhorar a qualidade do solo, proporcionando aumento da produção e no teor de nutrientes em plantas de alface (SILVA et al., 2001). A adubação orgânica não apenas incrementa a produtividade, uma vez que proporciona plantas com características qualitativas distintas das cultivadas, exclusivamente, com adubos minerais exercendo influência sobre a conservação no período pós-colheita (SANTOS, 2005).

O baixo custo de produção e a comercialização segura fazem com que a hortaliça seja a preferida pelos pequenos produtores. Este fato confere ao cultivo da alface grande importância econômica e social no Brasil, sendo significativo fator de agregação do homem ao campo (MEDEIROS et al., 2007).

A composição de nutrientes da alface é, aproximadamente: água (95%), carboidratos (1,7%), proteínas (0,6%), fibras (1,1%) e de minerais como cálcio e fósforo, traços de ferro e vitaminas A, B2 e C e outras (KAGAWA, 2004).

## **2.2.O paradoxo do consumo de hortaliças frescas e implicações na saúde humana**

A ingestão de frutas e hortaliças em quantidades abaixo do ideal foi apontada como um dos cinco principais fatores envolvidos na ocorrência de doenças crônicas e degenerativas em todo o mundo. Desde então, guias alimentares têm sido elaborados com a recomendação de que a população aumente o consumo de frutas e vegetais para

cinco ou mais porções diárias, a fim de melhorar o seu estado nutricional diminuindo a incidência dessas doenças. O objetivo é evitar que os recursos financeiros do país sejam insuficientes para manter a saúde da população, principalmente daqueles com idade superior a 50 anos (WHO, 1998).

Consumidas cruas, frutas e hortaliças vindas do campo sempre foram consideradas como alimentos seguros. Porém, infecções humanas tradicionalmente adquiridas através da ingestão de alimentos de origem animal trocaram de veículo e passaram a ser transmitidas por hortaliças. Conseqüentemente, os surtos de doenças de origem alimentar, devido ao consumo de hortaliças frescas contaminadas, aumentaram nas últimas três décadas (SIVAPALASINGAM et al., 2004). A maioria dos casos informados foi causada por bactérias patogênicas, especialmente *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella*. Essas duas bactérias foram encontradas em carnes cruas, laticínios, hortaliças, alface e água (WACHTEL; CHARKOWSKI, 2002; RHEE et al., 2003; VERNZOY-ROZAND et al., 2005). A contaminação com ambas as bactérias ocorreu ainda no campo por meio da água de irrigação e do esterco (SIVAPALASINGAM et al., 2004; FRANZ et al., 2005). A dose infectiva de *E. coli* O157:H7 é tão baixa quanto 10-100 UFC-g<sup>-1</sup> de alimento (SHEARER; STRAPP; JOERGER, 2001). Além de bactérias, os surtos foram causados por parasitas e vírus (MEAD et al., 1999).

Fontes de microrganismos em produtos frescos no estágio anterior à colheita incluem fezes, água de irrigação, compostagem inadequada do esterco usado como adubo, solo, ar, animais silvestres e domésticos e manipulação humana (BEUCHAT, 1996; BUCK; WALCOTT; BEUCHAT, 2003).

No campo, uma preocupação crescente é a disposição segura do esterco usado como adubo, oriundo das criações intensivas. Este é um problema relacionado à segurança alimentar, uma vez que o esterco comumente contém patógenos. As tecnologias intensivas de criação de animais, introduzidas para minimizar custos de produção da carne, têm conduzido a doenças zoonóticas, consideradas emergentes, que afetam os humanos (FAYER et al., 2004).

Após a colheita, as condições do transporte, as temperaturas de armazenamento, assim como o contato com superfícies de utensílios, equipamentos e manipuladores durante processamento são outras fontes que podem contribuir para contaminação adicional (BEUCHAT, 1996).

A ocorrência de doenças de origem alimentar, causada por bactérias patogênicas, é problema em nações em desenvolvimento assim como nas desenvolvidas (FANG, 2005). Estas doenças resultam para o país em sobrecarga econômica e perda de saúde da população. As doenças de origem alimentar são especialmente severas em crianças, idosos e imunocomprometidos (BAILEY, 1998).

Nos Estados Unidos, entre 1973 e 1997, oito surtos associados com alface foram causados por patógenos humanos, inclusive, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* (SIVAPALASINGAM et al., 2004). As bactérias *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Salmonella enterica* serovar Enteritidis são as mais frequentemente isoladas em surtos de doença de origem alimentar no mundo (LIM et al., 2003).

No Brasil, dados sobre doença de origem alimentar estão disponibilizados. Por exemplo, na cidade de Viçosa, Minas Gerais, o Serviço de Vigilância Epidemiológica foi instituído no final da década de 1990. A vigilância epidemiológica é um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, detecção e prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes da saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar medidas de prevenção e controle das doenças e agravos (BRASIL, 1990). Este serviço realiza o acompanhamento de agravos, definidos em nível nacional como os de notificação compulsória, agravos inusitados e surtos. Os dados são colhidos dos relatórios emitidos do atendimento de oito unidades de saúde e dois hospitais locais. Os registros de atendimentos e notificações são documentados e armazenados em bancos de dados de sistemas de informação. As análises desses dados são realizadas pelo Serviço de Vigilância Epidemiológica, do Departamento de Saúde Coletiva da Secretaria de Saúde da Prefeitura Municipal de Viçosa, Minas Gerais. O objetivo principal deste serviço é que as informações geradas sirvam de base para construção de indicadores úteis para planejamento e avaliação das políticas preventivas de saúde municipais, estaduais e federais, principalmente no caráter preventivo. Dentre outras atividades, a vigilância epidemiológica realiza o Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA). Os resultados desse monitoramento no ano de 2005 foram disponibilizados para essa pesquisa e estão apresentados na Figura 1.

Durante o ano de 2005, três unidades de atendimento do Programa da Saúde da Família (PSF), sendo as unidades de Nova Viçosa, Amoras e Cachoeirinha e os dois hospitais do município, realizaram o monitoramento semanal das doenças diarreicas agudas com a finalidade de conhecer o comportamento usual das doenças diarreicas e dos principais motivos que levam à sua ocorrência. Porém, os agentes de saúde informaram que, mesmo com empenho, há subnotificação.

Esta foi uma ação importante. Talvez, com mais recursos disponibilizados, os casos notificados possam ser investigados e as causas elucidadas.

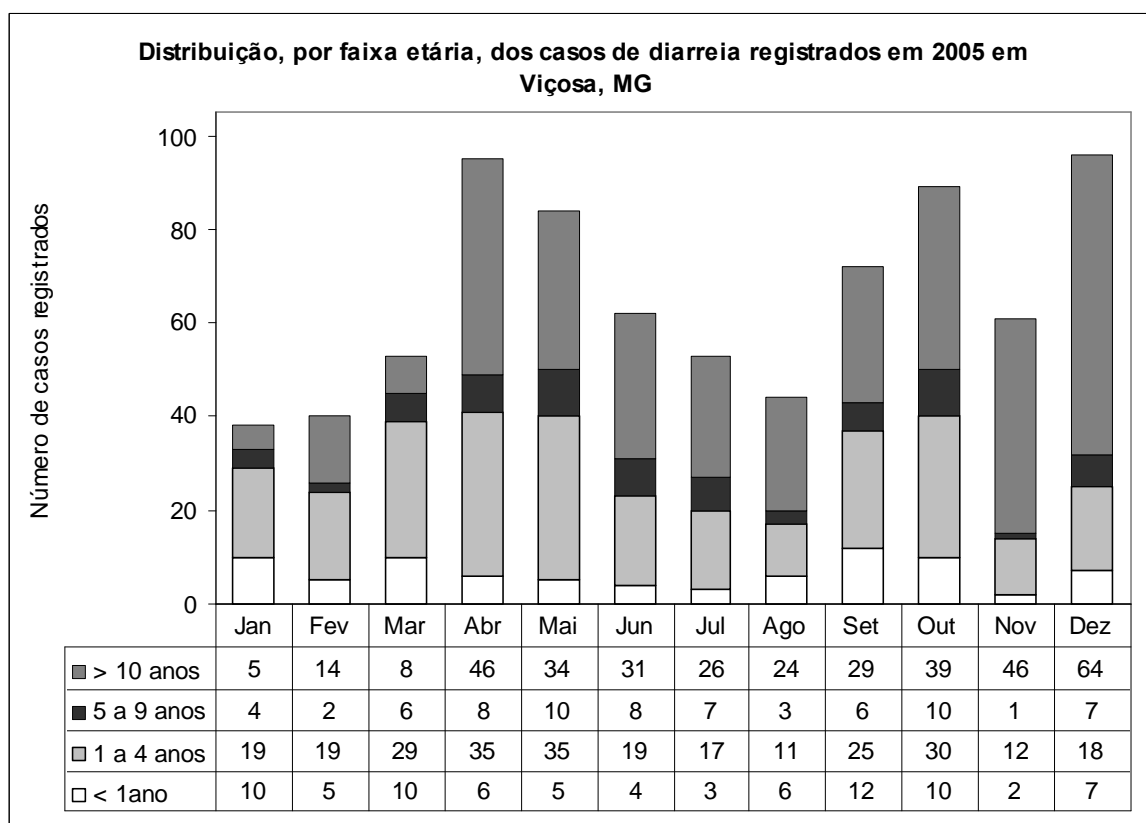


Figura 1 - Distribuição por faixa etária dos casos notificados de doenças diarreicas agudas no ano de 2005 registrados no município de Viçosa, MG.

### **2.3. Tratamentos para redução da microbiota em hortaliças consumidas cruas**

Os métodos tradicionais para reduzir populações microbianas das superfícies de frutas e hortaliças são desenvolvidos por meio de tratamentos físicos ou químicos. Uma variedade de protocolos e agentes químicos sanitizantes estão disponíveis para uso. Uma vez que nem todos os tipos de hortaliças podem ser submetidos a um mesmo processo, devido à sua estrutura delicada, é preciso conhecimento para decidir sobre diferentes estratégias de eliminação dos microrganismos. No controle da contaminação exige-se que os tratamentos de limpeza sejam empregados, inclusive nos equipamentos e utensílios e outras superfícies que entram em contato com as hortaliças.

Métodos de limpeza e sanitização de hortaliças envolvem a aplicação de água, detergentes e tratamento mecânico das superfícies por escovas ou *sprays* seguidos por enxágue com água potável. O passo de enxágue pode incluir um tratamento de sanitização. É importante assegurar que a água utilizada seja de boa qualidade para não se tornar um veículo de contaminação. A eficácia do método utilizado em reduzir as populações microbianas vai depender do tipo de tratamento, tipo e fisiologia dos microrganismos, características das superfícies do vegetal, tempo de exposição ao



tratamento, concentração dos produtos, pH e temperatura. Além disso, a concentração dos produtos químicos ou de outro método utilizado é limitada por causa da aceitação sensorial do consumidor (PARISH et al., 2003).

A lavagem das hortaliças é um dos primeiros procedimentos usados após a colheita. A água é utilizada para desalojar resíduos sólidos e remover o calor do campo, resfriando-a. Neste procedimento, remove-se apenas alguns dos microrganismos superficiais, ou seja, aqueles que não estão protegidos do material mucilaginoso natural da planta. De modo geral, a lavagem remove cerca de um ciclo logarítmico do número de microrganismos. Porém, se a lavagem é feita com água reutilizada, e não em água corrente, pode haver aumento da população de microrganismos ou da probabilidade de espalhar a contaminação de patógenos (PARISH et al., 2003).

Outro problema que pode ocorrer durante a lavagem é a infiltração de patógenos nos tecidos vegetais. A infiltração depende de temperatura, tempo e pressão. Quando a pressão da água supera a pressão interna dos gases e a natureza hidrofóbica da superfície, pode acontecer a infiltração. A infiltração é aumentada se a temperatura da hortaliça é mais alta que a da água que contiver células de microrganismos patogênicos em suspensão. Esse problema pode ser exacerbado pela adição de detergentes e surfactantes à água e ocorre, provavelmente, pela redução da tensão superficial da água na interface ar-água com cutina e células parenquimais danificadas ou poros, conduzindo os microrganismos para o interior dos tecidos. Independentemente do modo de infiltração, as células podem estabelecer microcolônias que são extremamente difíceis de ser alcançadas com soluções químicas aquosas (PARISH et al., 2003).

A deterioração de hortaliças servidas como salada crua pode ocorrer devido a fatores fisiológicos como respiração, transpiração e atividade enzimática no tecido vivo no período pós-colheita e processamento. Além disso, a deterioração pode acontecer por causa da atividade microbiana. Portanto, a eliminação de bactérias na superfície ou no interior de alimentos é importante, não somente por causa dos seus efeitos patogênicos aos humanos, mas é fundamental para a qualidade e tempo de vida útil dos alimentos (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994).

O tratamento com sanitizantes químicos não é suficiente para manter o produto seguro, portanto é preciso utilizar também temperaturas baixas para retardar a atividade enzimática e microbiana. O problema é que bactérias psicrófilas Gram-negativas como *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp. e *Flavobacterium* spp. continuam a crescer em temperaturas de refrigeração (BRAUN; SUTHERLAND, 2005).

Segundo Parish et al. (2003), o melhor método para evitar microrganismos patogênicos em hortaliças, de maneira relevante é prevenir a contaminação. Mas, uma

vez que na produção primária, isso nem sempre é possível, então o ato de lavar e sanitizar continua sendo o procedimento de importância na prevenção de surtos de doenças de origem alimentar veiculadas por produtos frescos.

Microrganismos patogênicos humanos associados a hortaliças e frutas, inteiras ou cortadas, comercializadas na condição de prontas para consumo, podem causar surtos de doenças de origem alimentar. É real a necessidade de mais esforços para reduzir os riscos de doenças ocasionadas pelo consumo desses produtos (PARISH et al., 2003).

Os métodos tradicionais de limpeza de hortaliças e frutas incluem os passos de uma pré-lavagem realizada somente com água, aplicação de detergentes e auxiliares para remoção de resíduos orgânicos e minerais, enxágue e sanitização com produtos químicos. Os sanitizantes mais comuns, aprovados para serem utilizados em alimentos, são de baixa eficiência e raramente reduzem em mais de 2 ciclos logarítmicos a população de microrganismos em hortaliças e frutas (BRACKETT; SPLITTSTOESSER, 2001).

A eficácia do método utilizado vai depender do tipo de tratamento, competência fisiológica dos microrganismos, características das superfícies dos alimentos, tempo de exposição, concentração das soluções, pH e temperatura. A ineficácia dos sanitizantes utilizados para descontaminar a superfície de hortaliças e frutas tem sido atribuída à incapacidade dos princípios ativos em alcançar os sítios em que estão alojadas as células microbianas. A infiltração de patógenos em rachaduras, aberturas naturais e espaços intercelulares, foram demonstrados por vários pesquisadores. Esses nichos promovem segurança, sobrevivência e mesmo crescimento no período em que o produto é processado até que ocorra o consumo (BURNETT; CHEN; BEUCHAT, 2000).

Brackett (1990) sugeriu que a redução das populações microbianas por limpeza e sanitização e seu posterior controle utilizando-se atmosferas modificadas pode permitir que populações de patógenos humanos proliferem nas superfícies dos produtos. Isto porque a redução de populações microbianas mistas das superfícies diminui a competição por espaço e nutrientes, proporcionando condições para o crescimento dos patógenos, reconhecidos como maus competidores. Segundo esse autor, isto pode, teoricamente, resultar em um produto não deteriorado, mas, inseguro para consumo. A indústria de alimentos tradicionalmente utiliza a deterioração natural como medida de controle para a segurança alimentar. Aumentar o tempo de prateleira do produto pode não ser desejável quando aumentam as chances de crescimento de microrganismos patogênicos antes que a deterioração ocorra e seja detectada pelo consumidor.

Neste cenário adverso, Conway, Leverentz e Saftner (2000) observam que a proliferação de microrganismos deterioradores no período pós-colheita pode comprometer a integridade das coberturas naturais como peles e cascas e alterar o pH

dos produtos, aumentando assim as chances de sobrevivência e de crescimento de patógenos humanos.

### **2.3.1. Produtos à base de cloro**

Há várias décadas que os compostos à base de cloro são usados pela indústria e em outros locais que processam hortaliças, a fim de reduzir a carga microbiana do alimento e das superfícies de processamento (CHERRY, 1999).

A formação de produtos clorados orgânicos, como os trialometanos, e o impacto deles na segurança humana e ambiental geraram buscas de alternativas para o seu uso. Os trialometanos são formados pela reação do cloro com ácidos fúlvicos e húmicos existentes na água (OPAS, 1987). O triclorometano é o que se forma em maior concentração, sendo responsável por 90% dos trialometanos totais. Também, podem ser formados pela reação com o cloro, diclorobromometano, dibromoclorometano e tribromometano (MEYER, 1994).

Segundo Silva Júnior (2007), o cloro é um dos sanitizantes mais baratos e mais convenientes no uso contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos em serviços de alimentação e restaurantes comerciais do Brasil.

Os principais compostos clorados inorgânicos são o hipoclorito de sódio, o hipoclorito de cálcio e o dióxido de cloro. Já os orgânicos são cloramina T, dicloroamina T, diclorodimetil hidantoína e ácido dicloroisocianúrico. Os compostos clorados orgânicos, produtos da reação do ácido hipocloroso com aminas, iminas, amidas e imidas, são comercializados na forma de pó e apresentam melhor estabilidade no armazenamento. São mais estáveis em solução aquosa liberando o ácido hipocloroso mais lentamente, permanecendo ativos por mais tempo (DYCHDALA, 1977).

As concentrações mais utilizadas variam entre 50 e 200 mg·L<sup>-1</sup> para sanitizar superfícies de alimentos e de equipamentos do processamento. Porém, concentrações mais altas são recomendadas para sanitizar sementes que serão germinadas para produção de brotos que serão consumidos por humanos (FDA, 2008).

Quando o produto clorado, orgânico ou inorgânico está em solução aquosa, ele libera o ácido hipocloroso. Em sua forma não dissociada apresenta ação bactericida (Figura 1). O ácido hipocloroso é um ácido orgânico fraco, cuja constante de dissociação é  $3,18 \times 10^{-8}$  a 30 °C. Em solução aquosa, dissocia-se formando o íon hidrogênio e o íon hipoclorito. O ácido hipocloroso é a forma livre que tem a mais alta atividade bactericida sobre vários tipos de microrganismos. Em solução aquosa, o equilíbrio entre o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito depende de pH (TROLLER, 1993; MEYER, 1994).



A quantidade de ácido hipocloroso nas soluções cloradas é determinada pela constante de dissociação do ácido, pH concentração em cloro residual total. Esses fatores podem estar relacionados num rearranjo da equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 2):

$$mg / L_{HClO} = \frac{mg / L}{1 + 10^{pH - pka}} \quad (\text{Eq. 2})$$

A equação demonstra o quanto é importante o pH da solução clorada. Os compostos clorados são mais efetivos em valores de pH baixos quando o ácido hipocloroso é dominante.

Embora o modo exato de ação não seja conhecido, o principal efeito desinfetante do ácido hipocloroso é causado por atividade oxidativa. Em células vegetativas, proteínas e ácidos nucleicos são destruídos, causando alterações irreversíveis e interrompendo a síntese proteica. A inibição de enzimas da via glicolítica é a teoria mais aceita para explicar a ação bactericida dos compostos clorados. O mecanismo de inativação de esporos é diferente por causa da capa proteica (BLOOMFIELD et al., 1994).

Valores de pH entre 6,0 e 7,5 são recomendados para soluções sanitizantes, a fim de minimizar a corrosão de equipamentos e melhorar a eficiência do tratamento com cloro. Além disso, a concentração de ácido hipocloroso é influenciada pela temperatura, presença de matéria orgânica, luz, ar e metais. A máxima solubilidade do cloro é observada em temperaturas de 4 °C. Uma importante sugestão é que a temperatura das soluções cloradas seja, pelo menos, 10 °C mais alta do que a temperatura do alimento. O motivo é reduzir a possibilidade de infiltração causada pelo diferencial de pressão gerado pela temperatura. Porém, a infiltração de microrganismos pode ser minimizada pelas boas condições sanitárias da água utilizada na higienização (PARISH et al., 2003).

A eficiência do tratamento usando soluções cloradas na redução de populações de microrganismos patogênicos humanos em hortaliças frescas foi informada por vários autores. Fett (2002) informou sobre a inativação de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp em feijão da variedade mung contaminados intencionalmente. Zhuang, Beuchat e Angulo (1995) estudaram a influência da temperatura do tratamento com água clorada sobre células de *Salmonella montevideo* na superfície e no interior de tomates. E, Weissinger et al. (2000) avaliaram a eficácia do tratamento com água clorada sobre *Salmonella baidon* em alface e tomate fatiados. Ainda, Beuchat, Adler e Lang (2004) investigaram a

eficiência do tratamento usando produtos clorados para inativar *Listeria monocytogenes* na alface do tipo *iceberg* e romana, simulando condições comerciais de processamento.

De modo geral, os estudos têm demonstrado que o tratamento com água clorada tem limitado efeito bactericida. Mas, a água clorada é amplamente utilizada para sanitizar frutas e hortaliças em escala comercial (MCWATTERS et al., 2002).

### **2.3.2. Ácidos orgânicos**

Dentre os produtos químicos que têm sido testados em sua eficiência na redução de populações de microrganismos patogênicos humanos em produtos frescos destacam-se os ácidos orgânicos (MCWATTERS et al., 2002).

Ácidos orgânicos como acético, propiônico, láctico e cítrico podem ser encontrados naturalmente em alimentos fermentados e frutas. Eles estão classificados como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para exercerem a função de agente antimicrobiano em alimentos. Ainda, podem ser utilizados em quantidades suficientes para obter o efeito tecnológico necessário, visando à proteção da saúde da população (FANG; HSUEH, 2000). Os ácidos orgânicos fracos são considerados mais efetivos contra microrganismos que ácidos inorgânicos (BUCHANAN et al., 2004). Os mecanismos da atividade antimicrobiana parecem ser comuns entre os ácidos orgânicos. A forma não dissociada desses compostos é capaz de difundir pela membrana celular e alcançar o citoplasma. Uma vez que o pH do citoplasma é mais alto do que pH do ambiente externo, algumas moléculas dissociam, havendo acumulação de prótons e ânions no citoplasma (BRUL; COOTE, 1999). Mecanismos da atividade antimicrobiana baseiam-se na inibição de enzimas, perturbação das funções da membrana, transporte de nutrientes e das atividades metabólicas da célula. Dentre os fatores que podem afetar a atividade antimicrobiana pelos ácidos orgânicos estão pH, concentração do ácido, temperatura e a resistência inerente de algumas bactérias (BJORNSDOTTIR; BREIDIT; MCFEETERS, 2006).

Ácidos orgânicos são frequentemente utilizados para preservar alimentos através de adição ou da fermentação microbiológica. Visto que muitos patógenos não podem crescer em pH abaixo de 4,5, a acidificação pode atuar prevenindo a proliferação bacteriana (FOEGEDING; BUSTA, 1991).

Em determinadas concentrações, os ácidos orgânicos têm potencial para serem usados na inativação de microrganismos. Com este fim, são utilizados na redução da carga microbiana de alimentos não processados termicamente como, por exemplo, carnes frescas e carcaças de aves, frutas e hortaliças frescas (ZHANG; FARBER, 1996).

Dentre as limitações para o uso dos ácidos orgânicos como agente bactericida, destacam-se: a) ineficiência quando o número de microrganismos no alimento está alto; b) utilização dos ácidos orgânicos como fontes de carbono por alguns microrganismos; c) variabilidade na resistência; d) seleção de linhagens mais resistentes, sob certas condições de uso (NACMCF, 1999).

Por serem baratos e disponíveis em locais como restaurantes comerciais, serviços de alimentação e ambiente doméstico, o vinagre apresenta uso potencial em tratamentos bactericidas de hortaliças. Portanto, é justificado o desenvolvimento de pesquisas que investigam a sua ação na segurança alimentar (SEGUN; KARAPINAR, 2005).

O vinagre (ácido acético) foi estudado quanto à sua eficiência em inativar microrganismos patogênicos de hortaliças, inclusive alface (WU et al., 2000; RHEE et al., 2003; CHANG; FANG, 2007). Wright et al. (2000) observaram que a imersão numa solução de 5% de ácido acético, por dois minutos, foi o tratamento mais eficiente, dentre outros investigados, para a redução da população de *E. coli* O157:H7 inoculadas na superfície de maçãs. Também, Chang e Fang (2007) informaram que o tratamento com vinagre comercial branco contendo 5% de ácido acético, pH 3,0, por 5 min e a 25 °C reduziu, em três ciclos logarítmicos, a população de *E. coli* O157:H7, que contaminava intencionalmente a alface. Porém, observaram que o tratamento com vinagre deixou odor forte à alface.

#### **2.4. Resposta das enterobactérias ao estresse ácido**

Na tentativa de aumentar a chance de sobreviver às adversidades ambientais, a célula sofre uma mudança molecular programada e sintetiza proteínas específicas induzidas pelo estresse. Algumas delas são induzidas sob diferentes condições e, por isso, são denominadas proteínas universais do estresse. Existem outras que são induzidas somente em respostas a um estresse específico. Entender como microrganismos sobrevivem ao estresse é fundamental para o desenvolvimento das tecnologias de processamento.

O gene *rpoS*, também denominado *katF*, é requerido para a síntese de pelo menos 30 proteínas induzidas pela depleção de carbono em células de *E. coli*. Também, pela transcrição de muitos genes que têm atividade aumentada durante a depleção de fosfato e de nitrogênio. A sequência de aminoácidos do produto do gene *rpoS* baseado em dados da sequência de nucleotídeos sugerem que é um fator sigma ( $\sigma^S$ ) (HELMANN; CHAMBERLAIN, 1988).

Células de *S. Typhimurium* na fase exponencial de crescimento em meio mínimo de glicose em pH 7,7 morrem rapidamente quando são trocadas para pH abaixo de 4,0. Porém, adaptando esses organismos para um meio ligeiramente ácido, com pH 5,8 por uma geração, aumenta a tolerância para condições mais extremas como pH 3,0. Esta resposta induzida de tolerância aos ácidos é um processo de dois estágios, que envolvem sistemas de proteção provocados por diferentes níveis de acidez. A) Primeiro estágio: a célula recorre ao chamado pré-choque ácido que envolve a síntese de sistemas de emergência da homeostase do pH que alcalinizam citoplasma durante o período de estresse ácido extremo, como pH 3,0. O sistema funciona para manter o pH acima de 5,0 quando células não estão adaptadas a um pH baixo e não podem sintetizar proteínas do choque ácido. Um desses sistemas foi identificado como lisina descarboxilase (CadA) trabalhando com a colaboração de um antiporte lisina-cadaverina (CadB). CadA descarboxila a lisina intracelular para cadaverina consumindo um próton no processo. A cadaverina é trocada por lisina do meio via antiporte CadB. B) Segundo estágio: uma resposta pós-choque ácido é disparada quando o pH fica abaixo de 4,5. São induzidas, aproximadamente, 50 proteínas do choque ácido para prevenir ou reparar danos a macromoléculas (FOSTER, 1995).

A regulação inclui um fator sigma alternativo, o fator  $\sigma^s$ , sistema de transdução de sinal de dois componentes, PhoP e PhoQ, e a principal proteína reguladora de ferro Fur (FOSTER, 1995; WATERMAN; SMALL, 1996).

O fator sigma alternativo, o fator  $\sigma^s$  codificado pelo *rpoS* é uma proteína do choque ácido que controla a expressão de pelo menos outras oito proteínas do choque ácido em *S. Typhimurium* (LEE et al., 1995).

A família Clp ATPase de proteínas chaperones está envolvida em uma variedade de atividades celulares diferentes associadas com conformação, formação e desagregação de complexos de proteínas bem como entregando proteínas específicas a ClpP para proteólise. Em *E. coli* ClpA e ClpX formam um complexo com ClpP para formar ClpAP e ClpXP proteases. ClpXP é responsável pela clivagem proteolítica do fator sigma em culturas de *E. coli* na fase exponencial. A proteólise por Clp é muito específica, e esta especificidade é devido a ClpA ou ClpX que ligam à proteína substrato numa reação que requer ATP e entrega o polipeptídeo para ClpP. É preciso ATP para a clivagem de grandes polipeptídeos por ClpP (WHITE, 2000).

Pesquisas revelaram que mutações em *rpos* tornaram *Salmonella* avirulenta, o que sugere que sub ou superprodução de RpoS é prejudicial ao processo da patogênese (BENJAMIM et al., 1991).

Outro regulador da tolerância a ácido é o regulador da captação de ferro Fur. Na presença de  $Fe^{++}$ , esta proteína de 17 kDa reprime a expressão genes que são regulados

pelo ferro. Mas, Fur também dirige a síntese de muitas proteínas do choque ácido atuando como um ativador e de maneira independente do ferro. Essa regulação ocorre até mesmo quando o sítio de ligação de ferro de Fur está comprometido. Isto gerou a hipótese de que Fur responde separadamente à presença de ferro e às alterações de pH. Mutações em Fur torna a célula mais sensível ao ácido. Porém, se os componentes do estresse ácido são prótons H<sup>+</sup> ou ácidos fracos que faz Fur regular ASP, ainda não são conhecidos (FOSTER, 1995; WATERMAN; SMALL, 1996).

Há evidências que ligam respostas ao estresse ácido com virulência (FOSTER, 1999). Estressadas, as células microbianas respondem de diversas maneiras, ou seja, podem produzir proteínas que reparam danos, realizam manutenção da homeostase interna e eliminam o agente estressante. A exposição ao estresse pode alterar a resposta e uma delas é a indução de sensibilidade a ácidos. Outras respostas ao estresse são: a) resistência ou tolerância a fatores deletérios; b) condução para um estado “dormente”, como formação de esporo ou estado viável não cultivável; c) capacitação para driblar as defesas do hospedeiro; e d) mutações adaptativas (ABEE; WOUTERS, 1999).

## 2.5.O setor de refeições e segurança alimentar

No Brasil, Silva Júnior (2007) avaliou 200 restaurantes industriais quanto aos principais pontos críticos de controle e critérios utilizados para controle eficaz da produção dos alimentos. Os resultados encontrados estão resumidamente apresentados na Tabela 1. Concluiu-se que os restaurantes garantem a segurança do consumidor, não monitoram os pontos críticos de controle e poucos executam as boas práticas de fabricação.

Tabela 1 - Pontos críticos de controle, critérios para produção segura de alimentos e porcentagem em conformidade

Ponto crítico investigado	Critérios utilizados na avaliação	%
Higiene dos vegetais	Lavagem e desinfecção	70
Manutenção em banho-maria	Temperatura de 60 °C ou acima	50
Tempo de manipulação	Até 1:30 h	50
Higiene das mãos	Lavagem e antisepsia	10
Higiene ambiental	Lavagem e desinfecção	10
Controle da matéria-prima	Visita técnica e análises	5
Manutenção em balcão frio	Temperatura de 10 °C ou inferior	1
Cocção	Temperatura de 74 °C no interior	0,5
Refrigeração	Temperatura de 4 °C em 4 h	0,5



O que ocorre no Brasil também acontece em outras partes do mundo. Mas, apesar das condições que operam, é inegável a contribuição dos estabelecimentos pequenos e dos menos desenvolvidos tecnologicamente para a economia de um país. Este fato chamou a atenção de órgãos como *Food and Agricultural Organization* – FAO e *World Health Organization* – WHO. Firmaram a importância da proteção ao consumidor e conscientizaram que esta se aplica igualmente a todos os estabelecimentos que trabalham com alimentação. FAO e WHO compreenderam que empresas do setor alimentar enfrentam desafios complexos para assegurar a inocuidade dos alimentos, independentemente de sua localização geográfica (FAO, 2006a).

As dificuldades em relação à segurança alimentar são muitas e podem ser devido ao tamanho do empreendimento, à falta do conhecimento técnico, escassez de recursos econômicos ou, ainda, pela própria natureza dos trabalhos. Os principais desafios identificados foram quanto às instalações e infraestrutura. De modo geral, há problemas com o fornecimento de energia elétrica e água potável, saneamento básico, transporte, higiene e faltam as boas práticas de fabricação. Observou-se que estes recursos tendem a faltar mais em empresas pequenas e menos desenvolvidas. Assim, os problemas advêm da má localização, dimensionamento inadequado das áreas de produção, equipamentos antigos, má formação profissional e falta de tempo e empenho dos proprietários. Os recursos humanos também foram apontados como problemático. Existe alta taxa de rotatividade de pessoal ou tendência a contratos temporários. Há relutância em investir na formação desses colaboradores (FAO, 2006a).

FAO e WHO informaram também que as principais barreiras enfrentadas por grandes, médias e pequenas empresas do setor alimentar são: demandas dos clientes; pressões temporais sobre custos; falta de motivação e crença de que cuidar da segurança alimentar não faz, necessariamente, diferença para seu negócio. Outros fatores citados foram: falta de autossuficiência, descrença de que uma pessoa tenha a capacidade para organizar e executar tarefas; inércia, ou seja, incapacidade de superar o hábito de uma prática anterior, devido à falta de vontade de mudança; concordância, incapacidade de perceber de como sistemas de garantia da qualidade podem tornar os alimentos mais seguros. Concluíram que os setores pequenos e menos desenvolvidos da produção de alimentos confiam na intuição, experiência e um tanto na boa sorte para satisfazer clientes e atender aos requisitos da segurança alimentar. Isto acontece, praticamente, em todas as partes do mundo (FAO, 2006a).

Quando há organização e um bom sistema de vigilância operante, a situação é diferente. Nesse caso, todos os elementos necessários para ações para correção de falhas ocorridas e prevenção de falhas futuras estão disponibilizados. Por exemplo, *Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* – ACMSF (2005) divulgou

informações compiladas da Inglaterra e do País de Gales sobre surtos de doenças intestinais infecciosas ocorridas entre 1992 e 2003. Foram notificados 7.658 casos, sendo a causa de 1.763 destes foi identificada como de origem alimentar. Desses, 135 estavam associados com o consumo de saladas, frutas e hortaliças. Implicados com estes mesmos itens, mas, na condição de “prontas para consumo” foram identificados 64 casos. As bactérias causaram 32 deles, norovírus ocasionaram 11, mas, em 21 casos, a causa não foi conhecida. Dentre as bactérias identificadas, incluíram-se *Salmonella*, *C. perfringens*, *Campylobacter*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *B. subtilis*, *S. aureus* e *Shigella*. A associação das doenças com o local de consumo revelou que 20 casos ocorreram pelo consumo de saladas em restaurantes. Ao investigarem as causas constataram que as principais, em ordem decrescente, foram: contaminação cruzada, mão de manipulador infectada, estocagem inapropriada e tratamento térmico inadequado.

## **2.6.O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle**

O sistema Análise de Perigos e Pontos críticos de Controle (APPCC) é baseia-se na prevenção, que garante a conformidade do produto com as exigências de qualidade previamente definidas. Foi desenvolvido pela companhia *Pillsbury*, em conjunto com a NASA e o laboratório *Natick* das Forças Armadas Americanas para produzir alimentos seguros para o programa espacial da NASA. Na década de 1970, observou-se a primeira consciência pública dos conceitos do APPCC e, assim as indústrias de alimentos iniciaram o seu uso. O sistema APPCC ganhou força quando foi endossado pelo *National Advisory Committee on the Microbiological Criteria for Foods and Foods Ingredients* (NACMCF) que publicaram, em 1989, “HACCP: *principles for food production*”. O APPCC passou a ser exigido no sistema de qualidade de alimentos. A partir de 1995, o serviço de inspeção para segurança dos alimentos exigiu que abatedouros e plantas processadoras de alimentos programassem e desenvolvessem o sistema APPCC. Daí, a demanda pela sua implantação foi ampliada para vários países, surgindo com isso muitas complicações (FDA, 2001).

O sistema APPCC tem como fundamento ações, operações ou atitudes, essenciais para o controle, seguido de um monitoramento. O processo produtivo estará sempre sendo analisado garantindo a qualidade através de barreiras sequenciais do monitoramento. Este refinamento permite a melhoria contínua, assessorada pela segurança que o processo oferece (NOTERMANS et al., 1995).

Na prática, observou-se que o sucesso de um plano APPCC depende grandemente dos esforços prévios em Boas Práticas de Fabricação (BPF). Porém, as boas práticas de fabricação simplesmente apontam diretrizes gerais ao invés de uma

análise objetiva dos perigos. Mas, somente depois de implantadas as BPF, é que o sistema APPCC pode ser resumido a poucos Pontos Críticos de Controle (PCC), o que torna o sistema viável e facilita a gestão da rotina, durante o processamento de alimentos. Os procedimentos de controle são dirigidos a operações específicas, fundamentais, para garantir a segurança dos alimentos e permitir que os efeitos da contaminação de um produto sejam quantificados e que critérios sejam estabelecidos. Os PCC são definidos como pontos, procedimentos, entre outros, em que um perigo pode ser eliminado ou reduzido a níveis aceitáveis. Então, considera-se que uma operação está sob controle somente quando um perigo é eliminado ou reduzido a níveis aceitáveis (NOTERMANS et al., 1995).

A aplicação de um plano APPCC baseia-se em princípios técnicos e científicos que garantem a produção de um alimento seguro. Uma aplicação ideal deve incluir todos os processos, do campo à mesa. Os seus princípios podem ser aplicados à produção primária, abate/colheita/processamento, transporte e distribuição, preparações em serviços de alimentação e doméstica. O aspecto mais importante do APPCC é que ele é um sistema preventivo e não um sistema de inspeção do controle de perigos. A aplicação do APPCC é sistemática, porque fornece uma análise estruturada dos perigos.

Os princípios do sistema APPCC têm se tornado obrigatório pela Legislação Sanitária de Alimentos de diversos países. No Brasil, o sistema é regulamentado pela Portaria 1428 (BRASIL, 1993), do Ministério da Saúde, e Portaria 46, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1998).

Na Figura 2 são apresentados os princípios do APPCC e seus sete passos, como estabelecido pelo *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 1991) e uma proposta para critérios dos PCC para os perigos microbiológicos associados a doenças veiculadas por alimentos sugerido por Notermans et al. (1995). Se os resultados não forem aceitáveis, devem ser realizadas mudanças, seja na matéria-prima, no processo ou no armazenamento. O que foi estabelecido deve ser repetido até que os níveis de microrganismos perigosos à saúde se tornem aceitáveis (NOTERMANS et al., 1995).

## **2.7. Desenvolvimento de um plano APPCC**

Para desenvolver um plano APPCC é preciso reunir indivíduos que conhecem o processo de produção, além de outros que podem auxiliar com assistência técnica e científica e que devem conduzir cinco passos preliminares, conforme descritos subsequentemente:

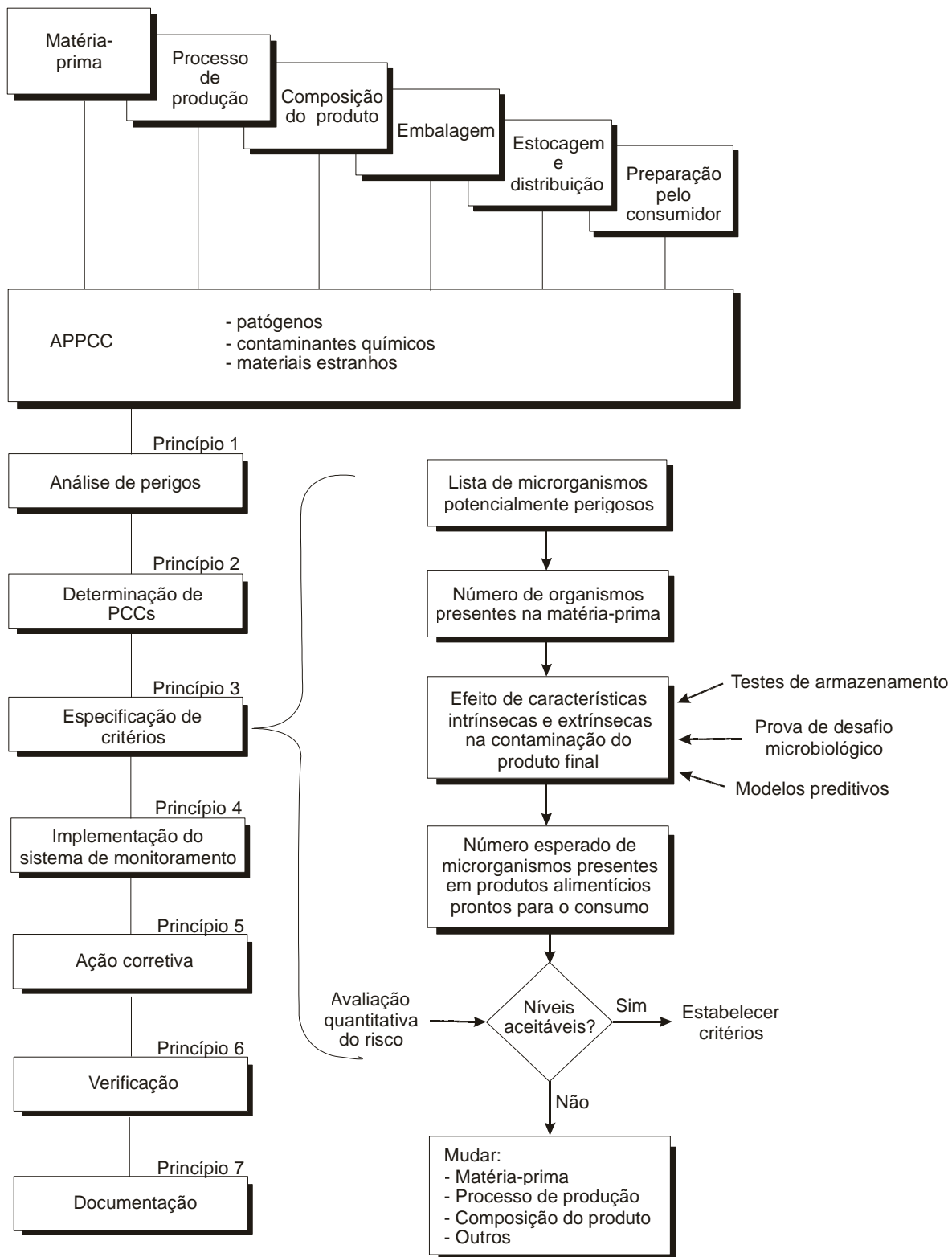


Figura 2 - Conceito do sistema APPCC com os seus sete princípios e uma proposta para estabelecimento de critérios para perigos microbiológicos associados a doenças de origem alimentar (NOTERMANS et al., 1995).

- Pré-APPCC 1) Reunir os recursos e o time APPCC: o número de pessoas deve ser de no máximo oito, quando o plano é desenvolvido em grandes companhias, e, ou, de três em pequenas.

- Pré-APPCC 2) Descrever o produto e seu método de distribuição: descrição de como o processo ocorre e como o produto é preparado.

- Pré-APPCC 3) Desenvolver uma lista completa de materiais usados na produção: listar materiais ou ingredientes que entram no processo de produção, inclusive embalagens.

- Pré-APPCC 4) Construir um diagrama de fluxo do processo: neste diagrama serão identificados todos os passos necessários para a obtenção do produto final.

- Pré-APPCC 5) Conhecer os padrões regulatórios para Procedimentos Operacionais Padrão de Higienização (POPH). Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Operacionais Padrão de Higienização (POPH) são requisitos básicos e fundamentais para o sucesso do plano APPCC. O plano APPCC, por si só, não é o suficiente para garantir alimentos seguros para a saúde do consumidor.

Um plano APPCC é um documento escrito com delineamentos de procedimentos formais a serem seguidos, conforme os seus sete princípios gerais. Estes sete princípios tornaram-se a essência da abordagem sistemática para a aplicação do APPCC.

Os dois primeiros princípios fornecem as bases do plano APPCC. São essenciais, porque a aplicação dos outros princípios depende dos resultados da análise de perigos.

### **Princípio 1 - Análise de perigos**

Nesta fase, a análise de perigos deve ser conduzida em cada etapa da produção identificando locais (pontos) onde o perigo pode ocorrer. É específica para um determinado produto e bastante complexa. Possui três objetivos principais: i) identificar os perigos; ii) subsidiar a determinação dos pontos críticos de controle; e iii) modificar etapas do processamento para tornar o produto final mais seguro.

### **Princípio 2 - Identificar o(s) ponto(s) crítico(s) de controle requerido(s) para controlar o(s) perigo(s) identificado(s) na avaliação**

Ponto crítico de controle pode ser caracterizado como um procedimento em que não há etapas posteriores a ele capazes de eliminar o perigo ou prevenir que a contaminação chegue ao usuário do produto. A falha no controle em um PCC resulta na produção de alimento com alta probabilidade de causar doença de origem alimentar no consumidor.

**Princípio 3** - Estabelecer os limites críticos e as ações preventivas que devem ser monitoradas a cada ponto crítico de controle identificado

Critérios são limites para características físicas, químicas ou biológicas específicos para o alimento. Uma vez que é impossível a eliminação completa de um perigo, devem ser definidos níveis aceitáveis e específicos para um alimento. Os limites críticos devem ser estabelecidos, monitorados e registrados (NOTERMANS et al., 1995).

**Princípio 4** - Estabelecer procedimentos para monitorar o(s) ponto(s) crítico(s) de controle

O monitoramento é uma sequência planejada de observações ou medições e deve produzir um registro fiel para uso futuro na verificação. O monitoramento de um PCC deve ser feito a partir de análises simples, de baixo custo e que resultem em dados imediatos. A atividade deve ser rápida, realizada em caráter contínuo ou a intervalos regulares de tempo para indicar a situação ou condição durante a inspeção em qualquer fase do processamento. Por isso, métodos físicos ou químicos, as observações visuais e as análises sensoriais são os preferidos (NOTERMANS et al., 1995).

**Princípio 5** - Estabelecer ações corretivas que devem ser desenvolvidas quando há um desvio identificado pelo monitoramento a um dado ponto crítico de controle

As ações tomadas devem eliminar o perigo. Se o produto se tornar inseguro por causa de um desvio, deve ser removido, descartado ou retrabalhado. As ações podem ser amplamente variadas, mas devem manter o ponto crítico sob controle (NOTERMANS et al., 1995).

**Princípio 6** - Estabelecer procedimentos para verificar se o sistema APPCC está trabalhando corretamente

A verificação consiste de métodos, procedimentos e testes utilizados com a finalidade de determinar se o sistema continua de acordo com o plano. A verificação confirma que todos os perigos foram identificados quando o plano foi desenvolvido. As atividades de verificação incluem o estabelecimento de inspeções, incluindo a revisão do plano APPCC, coleção aleatória de amostras e realização de análises, revisão dos registros, realização de auditorias (NOTERMANS et al., 1995).

**Princípio 7** - Estabelecer um sistema de registro eficaz que documente o plano APPCC

Deve ser estabelecido um sistema de manutenção e guarda das informações documentadas pelo plano APPCC. Deve ter um arquivo e estar disponível no estabelecimento onde foi desenvolvido para inspeção oficial sempre que for requisitado.

A documentação a ser desenvolvida pode e deve ser alterada sistematicamente pelo grupo, de forma a atender aos objetivos do plano (NOTERMANS et al., 1995).

## 2.8. Realização da análise de perigos

O primeiro objetivo da análise de perigos é identificar os perigos potenciais. Pode ser, por exemplo, bactérias potencialmente perigosas à saúde humana presentes no alimento. Uma sequência de passos foi estabelecida e deverá ser seguida para realização dessa análise.

**Primeiro passo:** compilar uma lista de microrganismos relevantes para o alimento em questão e seu processo de produção. Esta lista de bactérias patogênicas deve ser compilada de uma análise dos surtos de doenças de origem alimentar que ocorrem em várias partes do mundo. Diversos países e a Organização Mundial da Saúde produzem anualmente sumários informando incidentes. Nessa lista podem ser incluídos microrganismos incomuns que envolveram alimentos e causaram surtos de doenças de origem alimentar e estão informados na literatura. A lista de microrganismos potencialmente perigosos deve incluir ambos os microrganismos, os comuns e os pouco comuns.

**Segundo passo:** analisar o alimento, o processo de produção e construir outra lista: a de microrganismos presentes no alimento nas etapas de processamento. A metodologia esclarece que pode ser um alimento específico ou produzido a partir de muitas matérias-primas, processado por um sistema específico ou um novo processamento que precisa ser avaliado. Assim, após investigação laboratorial os microrganismos isolados e identificados devem ser listados. De posse da lista, a análise de perigos pode ser conduzida.

**Terceiro passo:** identificar bactérias potencialmente perigosas. O objetivo dessa etapa é identificar, dentre os microrganismos listados, quais podem causar doença de origem alimentar envolvendo um produto idêntico ou relacionado. Portanto, é preciso determinar quais, dentre os microrganismos encontrados no alimento que permanecerão na lista. Uma série de perguntas, endereçada a cada um dos microrganismos, pode auxiliar na decisão. Após realização da análise de perigos, os microrganismos que permaneceram na lista devem ser separados em dois grupos: os que são infecciosos e aqueles capazes de formar toxinas no alimento que será consumido. Todas as bactérias infecciosas presentes devem ser consideradas potencialmente perigosas.

Para avançar na análise de perigos, outras questões devem ser respondidas. Para isso são necessários dados consistentes sobre o comportamento dos

microrganismos em relação às características do alimento e do processamento (NOTERMANS et al., 1995).

### **2.8.1. Produção de dados para análise de perigos microbiológicos na cadeia do campo à mesa**

Em casos onde nenhum dado está disponível, recorre-se à produção de dados específicos para o produto sobre investigação (NOTERMANS et al., 1995). Conforme proposto pela European Commission (2002), a transmissão dos perigos pode ser modelada ao longo da cadeia de produção, analisando-se os processos da fonte (campo) até o momento de consumo (mesa). Este modelo de transmissão segue a prevalência e a concentração do perigo junto ao processo produtivo. A cadeia de produção pode ser dividida em passos menores. Para cada passo, uma relação de entrada-saída deve ser descrita. Esta relação pode ser obtida por meio de três métodos: a observação, a experimentação laboratorial e a modelagem matemática (NOTERMANS et al., 1993; EUROPEAN COMMISSION, 2002).

**Observação:** vigilância diretamente no processo de produção. Tem a vantagem de ser específico para o processo-produto-microrganismo e a desvantagem de ser caro e demorado. Outra desvantagem é que os efeitos de vários fatores podem estar confundidos.

**Experimentação laboratorial:** tem a vantagem de desvendar os efeitos de vários fatores e de ser mais rápido. É relativamente barato, no caso de apenas um ou de poucos passos serem investigados. Como desvantagem, pode não ser muito preciso e nem ser específico para o processo, porque só alguns fatores podem ser estudados ao mesmo tempo e longe da situação prática.

**Teste de estocagem:** esse tipo de teste fornece informação específica de um produto em particular e em relação ao microrganismo investigado. O que pode limitar a conclusão geral sobre a segurança do produto. Porém, podem ser realizados sob condições normais ou abusivas para simular qualquer situação possível de ocorrer durante a distribuição do produto. Assim, podem ser disponibilizadas informações sobre a provável contaminação microbiana na hora de consumo. No caso de bactérias toxigênicas, o crescimento deve ocorrer para que haja produção de toxina. Então, é preciso estabelecer se o crescimento ocorre ou não no alimento. Se o crescimento não ocorre, o microrganismo deve ser excluído da lista. Mas, se ocorre, o microrganismo deve ser considerado potencialmente perigoso. Geralmente, os testes de estocagem são realizados no produto final e somente em casos em que os microrganismos de interesse estão presentes em números suficientes (NOTERMANS et al., 1993).



**O teste de desafio microbiológico:** é usado para responder se o processo de produção inativa o microrganismo, portanto, é apropriado quando a presença do microrganismo é incerta. Esses testes podem ser realizados com os microrganismos de interesse selecionados do processo de produção ou adquiridos de laboratórios. Nesse caso, dentre as cepas apropriadas incluiriam aquelas que causaram doença no passado pelo consumo de um produto. Eles não precisam ser realizados frequentemente, a não ser que sejam identificadas novas cepas com propriedades diferentes. Entretanto, os resultados de um teste desafio somente terão valor se o produto não for submetido a mudanças em sua composição, processamento, entre outros. Esse teste pode fornecer informações sobre a probabilidade de sobrevivência de um microrganismo-chave durante o processamento (*process challenge testing*). Pode também fornecer informação quantitativa sobre os efeitos de um sistema de preservação e acerca do impacto de condições abusivas (*product challenge testing*). Ao mesmo tempo, o teste desafio pode fornecer informação sobre o número provável de microrganismos ou quantidade de toxina presente em um alimento no momento de consumo (NOTERMANS et al., 1993).

**Modelagem matemática:** a vantagem dos modelos matemáticos é que eles exigem que o pesquisador adquira e organize todas as informações disponíveis de forma lógica, o que ajuda definir precisamente o problema em estudo e facilitar a troca de conhecimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Na maioria dos modelos desenvolvidos, utilizam-se meios de cultivos nutritivos líquidos ou sólidos, esterilizados, que simulam as condições de pH, atividade de água e nutrientes dos alimentos. Poucos modelos de crescimento bacteriano foram construídos em alimentos reais, muito menos em alimentos frescos (KOSEKI; ISOBE, 2005a).

## **2.9. Modelos matemáticos da microbiologia preditiva**

Os modelos matemáticos que avaliam a segurança e a qualidade dos alimentos estão fundamentados na análise cinética de modelos empíricos; devendo ser estabelecidas suposições quanto à aleatoriedade, normalidade e interpolação dentro da faixa dos fatores testados e não extrapolações, parcimônia (modelo que contenha menor número de parâmetros possíveis) e especificações estocásticas (o quanto a resposta esperada se desvia da resposta observada ou real) (MCMEEKIN et al., 1993).

### **2.9.1. Identificação dos fatores a serem controlados**

O desenvolvimento de modelos preditivos envolve uma série de etapas. Devem ser definidas características relacionadas à variável independente, dependente, o inóculo e aos meios experimentais (DODDS, 1993; WHITING; BUCHANAN, 1997).

**a) Variável independente:** os fatores intrínsecos que determinam o comportamento microbiano são, principalmente, pH, atividade de água e potencial de oxirredução, mas podem ser ainda outros fatores como presença de nitrito de sódio e ácidos orgânicos. Os fatores extrínsecos são características do meio no qual o alimento é estocado, por exemplo, temperatura, umidade e atmosfera. Já os fatores implícitos são as características inerentes ao microrganismo e como essas se comportam na presença de combinações dos fatores intrínsecos e extrínsecos.

A faixa de variação dos fatores ambientais deve incluir valores de interesse ao usuário do modelo. É desaconselhável usar valores da variável independente fora da faixa estudada para desenvolver o modelo (WHITING; BUCHANAN, 1997).

**b) Variável dependente:** a mudança da densidade da população bacteriana ao longo do tempo é, geralmente, a resposta primária medida. A velocidade de mudança é frequentemente expressa como a velocidade de crescimento. Pode ser representada pelo tempo de duração da fase lag, taxa de geração ou o tempo para atingir uma densidade populacional (MCMEEKIN et al., 1993).

**c) Inóculo:** o tamanho do inóculo é fator importante e tem que assegurar que a resposta microbiana seja medida (MCKELLAR; LU; KNIGHT, 2002; BEESSE et al., 2006). Ele pode influenciar, principalmente, o tempo de adaptação das células microbianas ao novo ambiente. Isso pode ser explicado pela variabilidade de células individuais nessa adaptação, porque nem todas as células se adaptam às novas condições ao mesmo tempo (SWINNEN et al. 2004).

Por exemplo, Augustim et al., (2000) estudaram células de *L. monocytogenes* crescendo em meio pobre e em condições subótimas. Observou que a fase lag é estendida quando o tamanho do inóculo é pequeno e, também, quando as células estão severamente estressadas.

Vários autores estudaram o efeito de fatores estressantes para as células bacterianas, como pH e temperatura na distribuição da duração da fase lag de células individualmente. Foi observado que quando os fatores de estresse aumentam, a fase lag é mais longa e, sua distribuição mais ampla, ou seja, intensifica a variabilidade. Além disso, o tempo de adaptação pode ser mínimo quando o inóculo é pré-adaptado na mesma temperatura da condição a ser modelada (SWINNEN et al., 2004).

**d) Meios experimentais:** o sistema experimental a ser usado no desenvolvimento de modelos preditivos será sempre um meio que permita o crescimento das células. Então, pode ser um meio de laboratório ou o próprio alimento. Os meios líquidos permitem a utilização de maior variedade de métodos de detecção diretos que distinguem e contam individualmente os microrganismos. Também, podem ser indiretos, que mensuram alguma propriedade da população. Se possível, o meio deve permitir a

distribuição uniforme do inóculo. Porém, os meios podem não simular com exatidão as condições do alimento sob as quais se pretende aplicar o modelo preditivo, sendo, às vezes, necessária a validação no alimento (MCMEEKIN et al. 1993).

Os modelos gerados a partir de um alimento são específicos para esse alimento. São caros e a logística do experimento, mais difícil. São também mais complexos, por causa da microbiota normal do alimento (ROSS; MCMEEKIN, 1991).

### **2.9.2. Planejamento experimental**

Nesse planejamento, condições, como pH, atividade de água e outros fatores intrínsecos devem ser bem definidos, pois, os modelos empíricos não são aplicados além da faixa definida em que o modelo foi gerado. Embora a heterogeneidade de muitos alimentos dificulte a geração de dados, existem alguns particularmente homogêneos como o leite, que podem ser utilizados. Na maioria dos casos, os meios microbiológicos laboratoriais são usados uma vez que é mais fácil modificá-los. Por exemplo, podem ser usados acidulantes e umectantes para ajustar o pH e a atividade de água, respectivamente. Entretanto, se o modelo for pretendido para alimentos específicos, os fatores devem ser também, específicos (BLACKBURN, 2000).

Além disso, os tempos de amostragem são considerações importantes no planejamento. Devem ser planejados de modo que a amostragem seja realizada em torno das regiões de mudanças mais rápidas da curva de crescimento como, por exemplo, a extremidade da fase de aceleração negativa para modelos de crescimento (ROSS; MCMEEKIN, 1991).

### **2.9.3. Coleta de dados**

**Métodos de medida:** a contagem em placa é o método direto preferido para enumeração. Uma das vantagens é que repetidas amostragens de um mesmo frasco de diluição fornecem dados que geram curvas mais precisas. Outra vantagem é que o limite de detecção é inferior a  $20 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Os indiretos, como turbidimetria e condutividade, são rápidos e permitem monitorar muitas amostras simultaneamente com automação dessas medidas (BEGOT et al., 1996; AUGUSTIM; ROSSO; CARLIER, 1999).

**O ciclo de crescimento das populações microbianas:** uma curva de crescimento típica para uma população de células está ilustrada na Figura 3. Uma curva de crescimento pode ser dividida em fases distintas, sendo a primeira, denominada fase lag, seguida da fase exponencial, fase estacionária e morte.

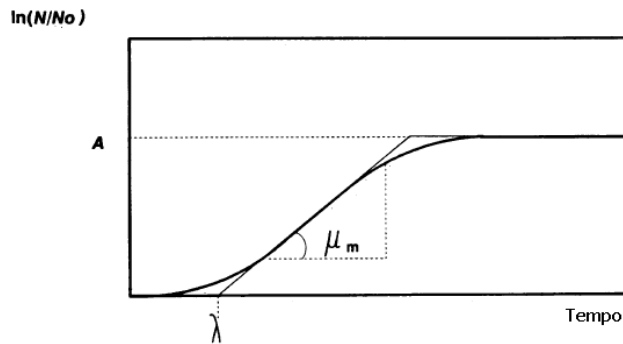


Figura 3 - A curva típica de crescimento microbológico (ZWITERING, 1990).

A fase lag é um período variável, em que não é observado aumento significativo da população. Ao contrário, é um período em que o número de organismos permanece praticamente inalterado. Essa fase ocorre porque as concentrações de várias coenzimas essenciais ou outros constituintes celulares necessários à absorção dos nutrientes presentes no meio encontram-se diminuídas e é exigido tempo para ressíntese. De modo geral, o período lag ocorre quando as células sofrem estresses físicos, como mudança de temperatura, exposição à radiação, a agentes químicos, ou quando são transferidas de um meio rico para outro de composição mais pobre. Na fase exponencial de crescimento, as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e duplicando. A maioria dos microrganismos unicelulares cresce exponencialmente, mas, as taxas do crescimento celular variam. A taxa de crescimento exponencial é influenciada por condições ambientais, bem como por características genéticas do microrganismo. A fase estacionária ocorre após crescimento exponencial, pela ocorrência de fatores que limitam o crescimento. Geralmente ocorre escassez de um nutriente essencial ou acumulação produtos que atingem quantidades inibitórias e cessa o crescimento exponencial. Nesta etapa, não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que divide é equivalente ao número de células que morrem. Na fase estacionária são sintetizados vários metabólitos secundários, que incluem antibióticos e algumas enzimas. Se a incubação continua, após alcançar a fase estacionária, muitas células podem morrer. Esta fase é denominada fase de declínio ou de morte. Nessa fase, a maioria das células está em processo de morte, embora outras ainda estejam se dividindo. Observa-se que o número de células viáveis cai lentamente e pode ocorrer lise celular (BROCK et al., 1994).

A determinação da duração da fase lag e exponencial em populações microbianas são importantes para ações que promovem a estabilidade microbológica dos alimentos. Em relação à vida de prateleira, observa-se que a deterioração ocorre antes que os microrganismos cheguem à fase estacionária. Assim, quanto mais longa a fase lag, maior será a vida de prateleira. Também, quanto maior a velocidade de crescimento na fase

exponencial, menor será a vida de prateleira do produto. Em relação à segurança alimentar, é altamente desejável a maior duração da fase lag e menor velocidade específica de crescimento dos microrganismos patogênicos (ROSS; MCMEEKIM, 1994).

A reprodução das respostas das populações microbianas aos fatores ambientais são as premissas da microbiologia preditiva. Os parâmetros cinéticos de crescimento podem ser determinados utilizando-se modelos preditivos de crescimento microbiano (ROSS; MCMEEKIM, 1994).

#### **2.9.4. Descrição matemática**

A escolha de uma função para descrever determinada resposta é um exercício estatístico, haja vista que se está lidando com estimativas de respostas reais. Em contrapartida, o ajuste da função escolhida é um exercício de álgebra e consiste na determinação dos valores dos parâmetros que melhor ajustam o modelo escolhido ao conjunto de dados coletados. O processo de ajuste baseia-se no método dos mínimos quadrados. A regressão é a técnica utilizada para quantificar a relação entre as variáveis (MCMEEKIN et al., 1993).

Os modelos matemáticos podem ser classificados em lineares ou não lineares nos seus parâmetros. E, de acordo com Ratkowsky (1983), os modelos não lineares podem, ainda, ser classificados como próximos ao linear ou distante do linear, conforme as características dos estimadores dos parâmetros.

##### **a) Modelos primários**

Descrevem a evolução de uma população de microrganismos ao longo do tempo sob determinadas condições, admitindo-se que estas condições permanecem estáveis durante o período de estudo. Nas equações primárias, os modelos são baseados em dois parâmetros principais de crescimento, que são a duração da fase lag ( $\lambda$ ) e taxa específica de crescimento máximo ( $\mu$ ). Os exemplos de modelos primários incluem o de Gompertz (GIBSON; BRATCHEL; ROBERTS, 1987); modelo linear e não linear de inativação térmica (ABRAHAM et al., 1990); modelos de inativação e sobreviventes (KAMAU; DOORES; PRUITT, 1990); e o modelo de Baranyi (BARANYI; ROBERTS, 1994).

##### **b) Modelos secundários**

Foram desenvolvidos para incluir os efeitos ambientais das condições não estáveis. Portanto, descrevem como os parâmetros cinéticos do modelo variam com as condições ambientais, por exemplo, temperatura, pH, atividade de água. Quando o crescimento dos microrganismos em um alimento é modelado e a temperatura é a

variável de interesse, os modelos podem basear-se nas equações de Arrhenius, de Bélerádek, (SKINNER; LERKIN, 1994) ou em modelos polinomiais (BUCHANAN; PHILIPS, 1990).

Pode-se dizer pela equação de Arrhenius, que a velocidade de crescimento é controlada pela velocidade limite de uma única reação enzimática. O modelo de Bélerádek baseia-se na relação linear que existe entre a raiz quadrada da velocidade de crescimento e a temperatura. Ainda, segundo esse modelo, os fatores ambientais são independentes, ou seja, não há interação entre os fatores. Porém, nem sempre é assim, pois a regressão pode não ser linear, mas polinomial. Os modelos polinomiais baseiam-se na metodologia superfície de resposta, em que os experimentos envolvem a determinação simultânea dos efeitos de muitos fatores no comportamento microbiano.

Quanto à complexidade os modelos para o crescimento bacteriano vão do mais simples ao mais complexo, de funções altamente não lineares. A análise de dados experimentais foi facilitada pelo desenvolvimento de *softwares* eficientes em análises de regressão não lineares.

### **c) Modelos terciários**

São combinações dos modelos primários e secundários aplicáveis a *softwares* que calculam o comportamento microbiano sob condições especificadas em sistemas amigáveis. Alguns foram desenvolvidos com base no modelo primário Gompertz e nos modelos secundários polinomiais. Ainda, explorando a capacidade dos modelos matemáticos, alguns autores consideraram esta abordagem da microbiologia preditiva para levar em conta o impacto das variabilidades e asincertezas sobre parâmetros dos modelos primários e secundários.

Dentre os *softwares* importantes têm-se:

*Food Micromodel*: desenvolvido pelo Ministério de Agricultura da Inglaterra, o *Food Micromodel* é um *software* consistente de modelos matemáticos que permitem ao usuário prever o crescimento, a sobrevivência e a inativação térmica de bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, usando-se um computador pessoal (BLACKBURN, 2000).

*Pathogen Modelling Program*: desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, é composto por modelos de crescimento para *Aeromonas hydrophila*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Shigella flexneri*, *S. aureus* e *Yersinia enterocolitica*. Todos esses modelos predizem o incremento da população microbiana em função do tempo (BUCHANAN, 1991).

*Pseudomonas Predictor*: desenvolvido pela Universidade da Tasmânia, o *software* baseia-se no modelo de crescimento das bactérias do gênero *Pseudomonas* e pode ser

aplicado para alimentos estocados sob diferentes atmosferas, podendo ser avaliado os perfis de crescimento a diversas temperaturas (NEUMEYER; ROSS; MCMEEKIM, 1997).

*Seafood Spoilage Predictor*: desenvolvido pelo Ministério da Pesca da Dinamarca, o *software* facilita o uso prático de modelos matemáticos. Pode prever o efeito de temperaturas constantes e variáveis sobre a taxa relativa de contaminação do alimento (DALGAARD, 1995).

### 2.9.5. Validação matemática

Nesta fase realiza-se a validação por meio de procedimentos de quantificação para verificar se o modelo encontrado descreve bem os dados experimentais (MCCLURE; COLE; DAVIES, 1994). É importante que o modelo preditivo tenha significado biológico. Fontes de variabilidade podem ser inerentes ao microrganismo, a erros sistemáticos dos métodos analíticos de laboratório e de técnicas de modelagem impróprias que descrevem os dados de maneira inadequada (BLACKBURN, 2000).

Para modelos que utilizam dados gerados em meios de laboratório, o erro relativo na predição, estimado para a taxa específica de crescimento, é de 7 a 10%. Para modelos primários e modelos secundários, de 20 a 50%. Existe um grau de aceitação ou rejeição do modelo. No caso de rejeição, podem ser requeridos dados microbiológicos novos ou somente o uso de uma técnica de modelagem mais apropriada para descrever os dados (BLACKBURN, 2000).

A adequação do modelo para prever os dados pode ser determinada com base em índices estatísticos e matemáticos (GIFFEL; ZWIETERING, 1999). Foram desenvolvidos dois fatores para validação: bias e exatidão, sendo depois modificados por Baranyi, Pin e Ross (1999), para quantificar a confiança nas predições do modelo. O fator bias indica se a média dos valores observados encontra-se acima ou abaixo da linha de equivalência. Ou seja, ao utilizar o fator bias é permitido avaliar com o mesmo peso, em média, tanto os valores preditos que superestimam quanto os que subestimam os valores observados (ROSS, 1996).

A Equação 3 representa o cálculo do fator bias.

$$Fb = 10^{(\sum \log(P/O) / n)} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que:

Fb é o fator bias;

n é o número de dados;

P é o valor predito; e

O é o valor experimental ou observado.

Quando o valor desse fator é maior que 1 indica que o modelo superestima as observações, sendo que as predições falham pelo lado perigoso “*fail dangerous*”. Quando esse valor é menor que 1 indica que o modelo é seguro “*fail-safe*” (ROSS; DALGAARD; TIENUNGOON, 2000).

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

A Equação 4 apresenta o cálculo do fator exatidão.

$$fe = 10^{\left( \frac{\sum \left| \log \left( \frac{\text{predito}}{\text{observado}} \right) \right|}{n} \right)} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que:

fe é o fator exatidão; e

n é o número de dados;

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

O coeficiente de determinação ou correlação ( $R^2$ ) também utilizado como uma medida total da predição alcançada, mede a fração de variação sobre a média que é explicada pelo modelo. O valor de  $R^2$  próximo de 1 ( $0 < R^2 < 1$ ) significa que o modelo explica melhor os dados (DUFFY; VANDERLINDE; GRAU, 1994).

A raiz quadrada do quadrado médio do resíduo (RMSE) representa uma medida do desvio das saídas preditas com o seu correspondente dado experimental. Este é a mais simples e a mais informativa medida da boa qualidade do ajuste (RATKOWSKY, 2003). Quanto menor o RMSE, melhor é a adequação do modelo para descrever os dados.

A raiz quadrada do quadrado médio do resíduo é a raiz quadrada da soma dos quadrados do resíduo dividido pelos graus de liberdade, conforme Equação 5.

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSE}{n}} = \sqrt{\frac{\sum (\text{observado} - \text{predito})^2}{n}} \quad (\text{Eq. 5})$$



## 2.10. Estudos de modelos da microbiologia preditiva

### 2.10.1. Modelos para descrever o crescimento microbiano (Modelos primários)

#### 2.10.1.1. Modelo de Gompertz

A maioria das equações que descrevem uma curva de crescimento sigmoide contém parâmetros matemáticos (a, b, c), ao invés de parâmetros que tenham significado biológico como a taxa específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ), a duração da fase lag ( $\lambda$ ) e a densidade populacional atingida (A). É difícil estimar os valores iniciais dos parâmetros se estes não têm significado biológico. Além disso, é difícil calcular os intervalos de confiança 95% para os parâmetros biológicos, se estes não forem estimados diretamente na equação, mas, têm que ser calculados a partir dos parâmetros matemáticos. Portanto, os modelos foram reescritos para substituir os parâmetros matemáticos pelos biológicos  $\mu_{max}$ ,  $\lambda$  e A.

A equação é originalmente assim descrita:

$$y = a \cdot \exp[-\exp(b - ct)] \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que:

y é o log da população bacteriana (UFC/g no tempo t);

a é o valor da assíntota do log N quando t decresce indefinidamente, equivalente ao log do número inicial de microrganismos ( $N_0$ );

b é a velocidade de crescimento ;

c é o valor do log N quando t aumenta indefinidamente; e

t é o tempo.

Para obter o ponto de inflexão da curva, a segunda derivada da função com relação a t é calculada:

$$\frac{dy}{dt} = ac \cdot \exp[-\exp(b - ct) \cdot \exp(b - ct)] \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} = ac^2 \cdot \exp[-\exp(b - ct) \cdot \exp(b - ct)] \cdot [\exp(b - ct) - 1] \quad (\text{Eq. 8})$$

Ao ponto de inflexão, em que  $t = t_i$ , a segunda derivada é igual a zero:

$$\frac{d^2y}{dt^2} = 0 \rightarrow t_i = b/c \quad (\text{Eq. 9})$$

Uma expressão para a máxima taxa específica de crescimento pode ser obtida através do cálculo da primeira derivada no ponto de inflexão.

$$\mu_m = \left(\frac{dy}{dt}\right)_{t_i} = \frac{ac}{e} \quad (\text{Eq. 10})$$

O parâmetro  $c$  na equação de Gompertz pode ser substituído por  $c = \mu_m e/a$ .

A descrição da linha tangente ao ponto de inflexão é:

$$y = \mu_m \cdot t + \frac{a}{e} - \mu_m t_i \quad (\text{Eq. 11})$$

O tempo lag é definido quando o eixo  $t$  intercepta a tangente através do ponto de inflexão da curva de crescimento:

$$0 = \mu_m \cdot \lambda + \frac{a}{e} - \mu_m t_i \quad (\text{Eq. 12})$$

Utilizando-se as equações 9, 10 e 12, tem-se:

$$\lambda = \frac{(b-1)}{c} \quad (\text{Eq. 13})$$

O parâmetro  $b$  na equação de Gompertz pode ser assim substituído:

$$b = \frac{\mu m^e}{a} \lambda + 1 \quad (\text{Eq. 14})$$

O valor da assíntota é alcançado com  $t$  tendendo ao infinito:

$$t \rightarrow \infty; y \rightarrow a \Rightarrow A = a \quad (\text{Eq. 15})$$

O parâmetro  $a$  na equação de Gompertz pode ser substituído por  $A$ , obtendo-se a equação de Gompertz modificada:

$$y = A \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu m^e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Eq. 16})$$

Mesmo sendo muito usada para descrever o crescimento microbiano, a equação de Gompertz modificada possui inúmeras falhas. A fase lag não é paralela ao eixo das abscissas e a assíntota matemática (número de células do inóculo) está fora de escala em tempo negativo. A equação não apresenta um período de aumento linear durante a fase de crescimento exponencial, conforme se observa na maioria das curvas de crescimento. Sendo assim, uma vez que a velocidade de crescimento exponencial é determinada por um ponto de inflexão na curva, o processo de ajuste tende a fornecer valores que variam mais do que as velocidades correspondentes determinadas por um período de crescimento linear (WHITING; BUCHANAN, 1997).

#### 2.10.1.2. Modelo Baranyi e Roberts

Para fornecer uma base mais mecanística e biológica, Baranyi e Roberts (1995) propuseram um modelo para analisar o crescimento bacteriano, que incluiu uma fase de crescimento exponencial linear,  $\mu(x)$ , e uma “fase lag” determinada por uma função de ajuste,  $\alpha(x)$ .

A hipótese básica é que a cinética celular é determinada por três classes de variáveis:

- As condições intracelulares definem o estado instantâneo da célula. Admitiram que este estado pudesse ser medido pela concentração de certas entidades bioquímicas como biomassa, enzimas ou RNA e DNA. A concentração por célula dessas  $n$  entidades podem ser representadas por um vetor  $z(t) = (z_1(t), \dots, z_n(t))$ , referidos como estado fisiológico ou interno.
- Condições extracelulares que são mudadas pelo metabolismo bacteriano. Estas quantidades estão envolvidas em um vetor,  $c(t)$ , também chamado categoria 1.
- Condições extracelulares que são independentes da cultura em crescimento. A variável vetor envolvendo essas quantidades é denominada de vetor externo da categoria 2 e é representado por  $D(t)$ , que possivelmente muda com o tempo. A entrada mais comumente modelada em  $D(t)$  é a temperatura,  $T(t)$ .

A composição do estado externo vetor formou o ambiente:  $E(t) = (c(t), D(t))$ , em que a função  $E(t)$  possui a descontinuidade à inoculação.

Para tornar um modelo utilizável, muitas simplificações foram feitas.

1) Foi admitido que a população bacteriana é homogênea, não considerando a possível distribuição espacial das células e a variação natural biológica, desconsiderando

que  $z(t)$  também tem distribuição de probabilidade. O erro devido a esta condição pode ser chamado de erro de homogeneidade.

2) A forma matemática das hipóteses básicas é que as cinéticas do sistema podem ser assim expressadas:

$$\frac{dz(t)}{d(t)} = f(z(t), c(t); D(t)) \quad (\text{Eq. 17})$$

$$\frac{dc(t)}{d(t)} = g(z(t), c(t); D(t)) \quad (\text{Eq. 18})$$

O ponto e vírgula separando a variável  $D(t)$  das demais indica que as funções  $f$  e  $g$  dependem do atual estado das condições externas independentes,  $D(t)$ . O mais simples exemplo é quando o valor das taxas constantes em  $f$  e  $g$  depende da temperatura externa.

Se  $D(t)$  é constante, então o sistema acima é chamado de autônomo. Isto significa que a célula injuriada recupera-se e gera as mesmas sucessivas sub-populações como se tivesse sido sempre íntegra ao longo da história. Não foi considerado o possível erro dessa autonomia assumida.

É preciso destacar que se a solução de (18) é substituída por (17), a equação diferencial obtida por  $z(t)$  é não autônoma.

Considerou-se que a concentração de células de uma população homogênea  $x(t)$  é a principal quantidade a ser modelada. A fissão binária ocorre se as condições internas e externas permitem. Portanto, a taxa de crescimento específico,  $\mu(t)$ , que pode ser considerada uma medida instantânea da taxa de nascimento *per* célula *per* unidade de tempo, depende de  $z(t)$  e  $c(t)$ :

$$\mu(t) = \phi(z(t), c(t); D(t)) \quad (\text{Eq. 19})$$

Após admitir essas hipóteses, a concentração de células pode ser calculada através da equação diferencial de primeira ordem:

$$\frac{dx(t)}{dt} = \mu(t)x(t) \quad (\text{Eq. 20})$$

Exceto por certas situações singulares, o sistema de equações diferenciais de primeira ordem tem a solução única, se as condições iniciais  $z(t_0)=z_0$ ;  $c(t_0)=c_0$ ;  $x(t_0)=x_0$  e a função externa  $D(t)$  for concedida.

Em outras palavras, a variação do sistema com o tempo, após  $t_0$ , é determinada pelas funções do modelo  $f$ ,  $g$ ,  $\phi$  e,

- o valor do vetor estado interno  $z(t)$ , no  $t_0$ ;
- o valor da categoria 1 do vetor externo;
- a categoria 2 do vetor externo,  $D(t)$ , como uma função do tempo.

Outra simplificação é admitir que  $z(t)$ ,  $c(t)$  e  $D(t)$  podem ser representados por somente uns poucos componentes, o suficiente para caracterizar o ambiente interno/externo por somente alguns fatores principais. Restringindo os fatores ambientais é introduzido um erro denominado *completeness error*. Por exemplo, enquanto a célula cresce produz calor e este calor não é a temperatura da variável externa de categoria 2, sendo um componente de  $c(t)$ , e não  $D(t)$ . Entretanto, a contribuição pequena desse calor é negligenciada.

O erro de homogeneidade pode ser diminuído estruturando-se as variáveis do sistema de forma aleatória ou utilizando-se um sistema heterogêneo. O *completeness error* pode ser diminuído tomando mais e mais variáveis em conta quando criando  $z(t)$ ,  $c(t)$  e  $D(t)$ .

O erro da predição pode aumentar se os dados coletados não são suficientes em quantidade ou precisão. Um modelo muito detalhado pode se tornar não funcional devido à falta de dados de boa qualidade. O erro devido à modelagem da cinética verdadeira pelas funções do modelo  $f$ ,  $g$ ,  $\phi$  serão referenciados como erro da função modelo. A construção matemática pode ser esquematicamente demonstrada como na Figura 4, em que as condições intra e extracelulares afetam mutuamente uma à outra.

A cinética entre  $z(t)$  e  $c(t)$  é descrita como função de  $f$  e  $g$ . Essas funções, entretanto, dependem do estado atual das condições externas como temperatura, atmosfera e outros que não são afetados pelo crescimento.

A probabilidade de uma fissão binária em um pequeno intervalo é  $\mu(t)\Delta t$ , em que  $\mu(t) = \phi(z, c; D(t))$ . Admitindo-se que a divisão de célula acontece aleatoriamente, por exemplo, de acordo com a distribuição Poisson, a mudança da concentração da população com o tempo pode ser descrita como na Equação 20.

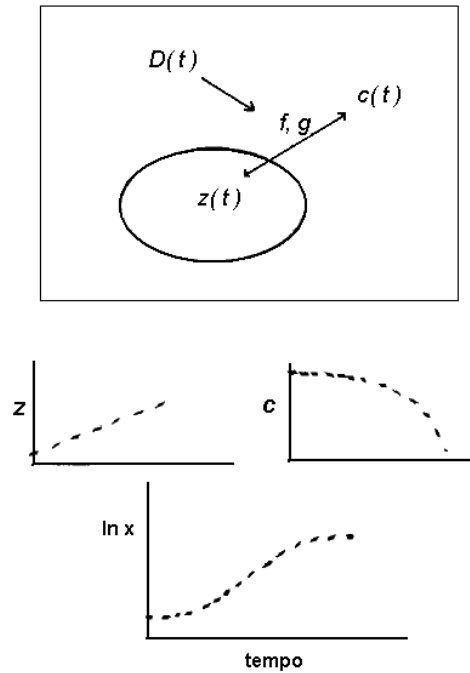


Figura 4 - Condições intra e extracelulares de uma célula,  $z(t)$  e  $c(t)$ , afetando mutuamente umas as outras. A taxa delas está descrita pelas funções  $f(z, c)$  e  $g(z, c)$ . Os parâmetros dependem do atual estado das condições externas, envolvidas em  $D(t)$ , que não são afetados pelo metabolismo bacteriano. Durante uma curva de crescimento típica, aumenta durante a fase lag e  $c(t)$  deteriora na fase estacionária.

No modelo de Baranyi; Roberts (1994), o vetor interno  $z(t)$  tem dois componentes, em que  $z_1(t)$  representa a quantidade per célula de uma substância crítica (como RNA ou ATP) causando o impedimento do crescimento, e  $z_2(t)$  é a biomassa da célula. A categoria externa 1,  $c(t)$ , possui somente um componente que é a concentração de nutriente. É admitido que a falta de substância crítica tem um efeito limitante de acordo com a cinética de Michaelis-Menten. De maneira similar, diminuindo a concentração de nutrientes causa limitação do crescimento:

$$\frac{dz_1(t)}{dt} = k_1 z_1(t) \quad (\text{Eq. 21})$$

$$\frac{dz_2(t)}{dt} = \frac{z_1(t)}{K_z + z_1(t)} k_2 \frac{c_1(t)}{K_c + c_1(t)} z_2(t) \quad (\text{Eq. 22})$$

$$\frac{dc_1(t)}{dt} = -\frac{1}{Y} \frac{dz_2(t)}{dt} \quad (\text{Eq. 23})$$

Em que:

$k_1$ ,  $k_2$ ,  $Y$ ,  $K_z$  e  $K_c$  são constantes do modelo dependendo somente das condições externas  $D(t)$ .

Decidir se os parâmetros são dependentes das condições externas,  $D(t)$ , é para a biotecnologia uma tarefa básica. Por exemplo, para a taxa  $k_1$  o modelo mais comum é o de Arrhenius na medida em que  $D(t)$  é basicamente definido pela temperatura.

A concentração celular  $z_2$  é admitida como proporcional à biomassa total. Portanto:

$$\mu(t) = \frac{dz_2(t)}{z_2(t) dt} = \frac{z_1(t)}{K_z + z_1(t)} k_2 \frac{c_1(t)}{K_c + c_1(t)} \quad (\text{Eq. 24})$$

A primeira equação do modelo já contém uma simplificação porque  $z_1(t)$  aumenta inicialmente, mas diminui quando a célula divide. A separação dos efeitos do ambiente interno e externo é refletida pela última fórmula ora descrita. A taxa específica de crescimento depende do estado fisiológico da célula (via  $z_1$ ); na categoria 1 condições externas, (via  $c_2$ ); e na categoria 2 condições externas (via constantes do modelo).

Observe que:

$$v = k_1 \quad (\text{Eq. 25})$$

$$\mu_{\max} = k_2 \quad (\text{Eq. 26})$$

$$\alpha(t) = \frac{z_1(t)}{K_z + z_1(t)} \quad (\text{Eq. 27})$$

$$u(t) = \frac{c_1(t)}{K_c + c_1(t)} \quad (\text{Eq. 28})$$

Os valores das funções  $\alpha(t)$  e  $u(t)$  estão entre 0 e 1. Isso porque  $k_2$  pode ser denominado taxa específica de crescimento máximo. A função  $\alpha(t)$  descreve a fase de adaptação fisiológica, que é controlada pela acumulação de substâncias críticas  $z_1(t)$ . Portanto,  $\alpha(t)$  converge para 1, quando  $t$  aumenta. A função limitante  $u(t)$  descreve a transição da fase de crescimento exponencial para a fase estacionária.

Por propósitos práticos, algumas simplificações foram feitas de acordo com considerações biológicas.

Em alimentos, a limitação de nutrientes ocorre somente quando há concentração muito alta de células. Mas, se os nutrientes fossem considerados como infinitos, resultaria em crescimento ilimitado. Portanto,  $u(t)$  é estimado por uma função limitante dependente do parâmetro de densidade celular máxima:

$$u(t) \approx 1 - \left( \frac{x(t)}{x_{\max}} \right)^m \quad (\text{Eq. 29})$$

Em que:

$x_{\max}$  é a concentração máxima de células; e

$m$  é o parâmetro que descreve a curvatura caracterizando a transição da curva de crescimento exponencial para a fase estacionária.

Esta é a concretização de técnica de uma notação anterior que  $x(t)$  pode sempre estar envolvido nos componentes de  $c(t)$ . O modelo obtido de  $x(t)$  é:

$$\frac{dx(t)}{dt} = \frac{z_1(t)}{K_z + z_1(t)} \mu_{\max} \left( 1 - \left( \frac{x(t)}{x_{\max}} \right)^m \right) x(t) \quad (\text{Eq. 30})$$

Em que:

$$\frac{dz_1(t)}{dt} = v_{z_1}(t) \quad (\text{Eq. 31})$$

Isto quer dizer que o efeito do crescimento bacteriano no ambiente extracelular é manifestado como crescimento autolimitante, sendo a fase estacionária causada naturalmente pela alta concentração de células. Obviamente, o erro devido a essa simplificação aparece somente em alta concentração de células. A vantagem dessa simplificação é que se  $D(t)$  é constante, o sistema de equações diferenciais tem uma solução explícita que faz o procedimento de ajuste da curva mais fácil.

Baranyi e Roberts (1994) propuseram uma solução para o logaritmo natural da concentração de células,  $y = \ln x(t)$ , sendo:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad (\text{Eq. 32})$$



Em que:

$y_0$  é a concentração de células no  $t_0$ ;

$\mu_{\max}$  é a taxa específica de crescimento máximo ( $h^{-1}$ );

$y_{\max}$  é a concentração máxima de células; e

$m$  é o parâmetro relacionado à curvatura depois da fase exponencial.

A fase lag ( $\lambda$ ) considera o tempo para a célula adaptar-se às novas condições ambientais, utilizar os nutrientes disponíveis e iniciar a reprodução celular, evidenciado pelo aumento das contagens bacterianas. Para expressar isso, a função  $A(t)$  representa a diminuição gradual da velocidade de crescimento ao longo do tempo. Essa função é assim expressa:

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})}{v} \quad (\text{Eq. 33})$$

Em que:

$$h_0 = -\ln \alpha_0 \quad (\text{Eq. 34})$$

$$\alpha_0 = \frac{z_1(t_0)}{K_z + z_1(t_0)} \quad (\text{Eq. 35})$$

O parâmetro  $\alpha_0$  é chamado de estado fisiológico da célula em  $t=t_0$ , e deve ser, pelo menos, de maneira aproximada, ou seja, a mesma para os experimentos onde a história pré-inoculação das células é idêntica. O parâmetro  $v$  define a curvatura da fase lag para a fase exponencial, admitindo-se que, após a inoculação, a substância crítica cresce à mesma taxa específica como as células na fase exponencial. A função  $A(t)$  considera as características do novo substrato e o estágio de crescimento do microrganismo inoculado. Estes são critérios importantes para avaliar como influências de diferentes fatores que promovem mudanças no meio e no metabolismo dos microrganismos afetam seu crescimento.

A hipótese básica do modelo é a suposição de que uma substância intracelular deve se acumular até certa quantidade antes que o microrganismo possa crescer. O crescimento exponencial é controlado pela taxa específica de crescimento, que segue a cinética de Michaelis-Menten. Por outro lado, a transição do crescimento exponencial à fase estacionária é descrita por uma função limitante.

Por causa de considerações biológicas e computacionais e outras simplificações pressupostas, esse modelo matemático tornou-se aplicável ao crescimento bacteriano no

ambiente dos alimentos. Ele apresenta várias vantagens computacionais comparado a outras funções sigmóides. O seu uso principal é prever a resposta do crescimento bacteriano quando há alteração de temperatura durante as fases lag e estacionária. Quando comparado a outros modelos primários, este modelo analisa o comportamento do microrganismo de forma mais completa do que a equação de Gompertz (BARANYI; ROBERTS, 1994).

Segundo Van Impe et al. (2005), o modelo de Baranyi e Roberts é amplamente utilizado por várias razões, dentre elas: facilidade de uso; aplicabilidade sob condições ambientais dinâmicas; boa capacidade de ajuste; e parâmetros biologicamente interpretáveis.

### **2.10.2. Modelos para descrever as variáveis ambientais no crescimento (Modelos secundários)**

Os modelos secundários descrevem as respostas de um ou mais parâmetros do modelo primário diante das mudanças do meio, como temperatura, pH e atividade de água (BLACKBURN, 2000). Três tipos de modelos secundários são mais frequentemente utilizados: os do tipo Arrhenius, os do tipo Bélehrádek e polinomiais.

A equação de Arrhenius (Equação 36) admite que a velocidade de crescimento é controlada pela velocidade-limite de uma única reação enzimática. Ratkowsky et al. (1982) explicaram que gráficos do logaritmo da taxa constante de crescimento contra a temperatura absoluta recíproca ( $1/T$ ) resultam em uma curva ao invés de uma reta. Como o crescimento bacteriano é um processo biológico complexo, que envolve uma variedade de substratos e enzimas, não é surpreendente que o modelo de Arrhenius não descreva adequadamente o efeito da temperatura sobre o crescimento bacteriano.

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \quad (\text{Eq. 36})$$

Em que:

k é a taxa de crescimento exponencial;

$k_0$  é um fator pré-exponencial;

$E_a$  é a energia de ativação;

R é a constante universal dos gases; e

T é a temperatura, em graus Kelvin.

Os modelos do tipo Bélehrádek estão fundamentados na relação linear que há entre a raiz quadrada da velocidade de crescimento e a temperatura. Admite-se ainda que os fatores ambientais sejam independentes, não existindo interação entre os fatores.

Denominado modelo raiz quadrada por Ratkowsky et al. (1982), esse modelo descreve o efeito da temperatura na taxa de crescimento bacteriano. É expresso pela seguinte equação:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (\text{Eq. 37})$$

Em que:

k é a taxa de crescimento;

b é o parâmetro a ser estimado;

T é a temperatura; e

$T_{\min}$  é a temperatura abaixo da qual não há crescimento.

Em muitos dos trabalhos realizados na microbiologia preditiva relacionados à temperatura utiliza-se o modelo da raiz quadrada. Porém, esse modelo não tem base biológica e está fundamentado na observação de que, a baixas temperaturas, a raiz quadrada da taxa específica de crescimento é linear. Uma modificação do modelo da raiz quadrada para modelar o crescimento em toda faixa de temperatura está descrito na Equação 38.

$$\sqrt{k} = b.(T - T_{\min}).(1 - e^{c.(T - T_{\max})}) \quad (\text{Eq. 38})$$

Em que:

k é a taxa de crescimento;

b é o parâmetro que representa a inclinação quando a taxa de crescimento aumenta;

$T_{\min}$  é a temperatura abaixo da qual não há crescimento;

$T_{\max}$  é a temperatura limite superior em que nela, e além dela, a taxa de crescimento predita é zero; e

c é o parâmetro que representa a inclinação quando a taxa de crescimento diminui.

Os modelos polinomiais baseiam-se na metodologia de superfície de resposta. Essa metodologia consiste em um conjunto de técnicas estatísticas úteis na modelagem em aplicações, em que a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis e o

objetivo é aperfeiçoar a resposta. Se a resposta é bem modelada por uma função linear das variáveis independentes, a função de aproximação é o modelo de primeira ordem:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p + \varepsilon \quad (\text{Eq. 39})$$

Se há curvatura no sistema deve-se utilizar um polinômio de ordem mais elevada, como o modelo de segunda ordem:

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Eq. 40})$$

Muitos problemas da metodologia da superfície de resposta utilizam um desses polinômios, ou ambos. Entretanto, se existir mais do que uma variável independente, a regressão linear múltipla pode ser utilizada (MONTGOMERY, 2001).

Outro modelo que tem chamado a atenção por causa de sua simplicidade e flexibilidade é o de Weibull. Este modelo descreve curvas com concavidade para cima, concavidade para baixo e linear. O modelo foi usado para descrever dados da inativação microbiana. Chen e Hoover (2003) usaram-no com sucesso para modelar a inativação térmica de *B. cereus* e *C. botulinum* e inativação sob pressão de *L. monocytogenes*. Guan et al. (2006) usaram o método de modelagem não linear de Weibull para estudar a inativação térmica de *S. aureus* e *E. coli* em temperaturas diferentes de processamento. Eles observaram que modelos lineares seriam inadequados para descrever respostas que apresentavam curvas com concavidade para cima ou para baixo. Também, Virto et al. (2005) usaram com sucesso um modelo matemático baseado na distribuição de Weibull para descrever a cinética de inativação de *Y. enterocolitica* por ácido cítrico e ácido láctico.

O modelo de Weibull apresenta a seguinte equação (PELEG; COLE, 1998):

$$k = b.T^n \quad (\text{Eq. 41})$$

Em que:

k é o parâmetro do modelo ( $\mu$ ,  $\lambda$  ou DMP) numa determinada temperatura T (°C);

b é o parâmetro de escala; e

n é o parâmetro de forma.

Estes parâmetros são obtidos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais. Quando  $n < 1$ , a concavidade da curva é para cima e, quando  $n > 1$ , a concavidade da curva é para baixo. Se  $n = 1$ , significa que é linear.

### 2.10.3. Modelos para descrever a cinética e inativação microbiana

Para determinação da resistência de um microrganismo a um determinado tratamento, todos os parâmetros devem ser mantidos constantes durante o tempo de exposição estabelecido. Os dados obtidos experimentalmente e ajustados por um modelo resultam em uma curva semilogarítmica de sobreviventes. O tempo necessário para destruição de 90% da população de esporos é o intervalo de tempo exigido para que a curva percorra um ciclo logarítmico. O tempo de redução decimal (valor D) é o principal parâmetro de avaliação das características de resistência da população microbiana homogênea a um tratamento. É o intervalo de tempo, em minutos, de exposição a condições constantes de tratamento, para redução de 90% da população microbiana, presente inicialmente no alimento. Numericamente, o valor D é o inverso negativo do coeficiente angular da equação da reta calculada, usando-se o método de regressão linear, através dos mínimos quadrados, aplicado a região linear da curva de sobrevivência. O valor D relaciona-se à constante específica de reação através da relação da Equação 42.

$$D = (2,303/k) \quad (\text{Eq. 42})$$

A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes, em relação ao tempo de exposição a uma condição constante, pode resultar em curva linearizada decrescente. A variação do número de sobreviventes com o tempo de exposição é função do número de microrganismos inicialmente presentes, sendo representada pela Equação 43.

$$\text{Log}(N_f) = \text{Log}(N_0) - (2,303/k)t \quad (\text{Eq. 43})$$

Em que:

$\text{Log}(N_f)$  é o logaritmo decimal da população sobrevivente, após um tempo (t) de exposição;

$\text{Log}(N_0)$  é o logaritmo decimal da população no tempo inicial (t=0); e

k é a constante de velocidade específica de inativação por unidade de tempo (t).

Curvas de sobreviventes semilogarítmicas curvilíneas são obtidas em ensaios para determinação de resistência de microrganismos envolvendo flora microbiana heterogênea ou com variações de resistência dentro de uma mesma espécie. Esses tipos de curvas são obtidos com mais frequência do que curvas logarítmicas lineares, em que a inativação é equivalente à cinética química de uma reação de primeira ordem (HOLDSWORTH, 2004).

Este resultado indica que existe numa mesma população a presença de grande número de organismos com a resistência muito baixa e um pequeno número de microrganismos altamente resistentes. Além disso, a cada geração microbiana ocorrem mutações genéticas na população, na ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ , que produzem espécies mutantes, mais ou menos resistentes do que a maioria das células de uma mesma suspensão (PFLUG, 1990).

Quando a inativação não obedece à cinética de primeira ordem, os métodos tradicionais de Bigelow e Ball, ou seja, os métodos tradicionais de estimar o valor D, não são apropriados para tratar cinéticas complexas não lineares (PFLUG, 1990).

Encontram-se na literatura vários modelos que foram propostos para descrever curvas de sobreviventes semilogarítmicas não lineares complexas e multifásicas com retardos e atrasos, ombros e caudas. Vários autores mostraram que os valores D de tais dados podem ser determinados por métodos diferentes (ABRAHAM et al., 1990; PRUITT e KAMAU, 1993; PELEG, 1997; GEERAERD; HERREMANS; VAN IMPE, 2000; VAN BOEKEL, 2002). Porém, não há consenso entre pesquisadores quanto ao modelo que descreve melhor tais cinéticas.

Pruitt e Kamau (1993) revisaram a história das teorias de crescimento e mostraram como os modelos clássicos de crescimento podem ser derivados como casos especiais da equação genérica da taxa de crescimento. Além disso, considerando que matematicamente a diferença entre crescimento e morte é questão de sinal, esses autores converteram curvas de crescimento em curvas de morte, mudando o sinal da equação de crescimento.

Como há evidências significativas de que as curvas de sobreviventes podem ser descritas por expressões cinéticas semilogarítmicas não lineares, o "IFT's *Research Summit 2003*" recomendou que a comunidade científica utilizasse e comunicasse sobre o uso de modelos alternativos para descrição do comportamento de populações microbianas sobreviventes após exposição a agentes letais (HELDMAN; NEWSOME, 2003).

Pruitt e Kamau (1993) desenvolveram modelos matemáticos para inativação:

a) Modelo exponencial de dois termos para populações de células mistas. Admite-se nesse modelo, que há duas populações de uma mesma bactéria que difere nas suas

sensibilidades ao agente letal e, por isso, morrem a taxas diferentes. A Equação 44 apresenta este modelo.

$$S = f e^{-b_1 t} + (1 - f) e^{-b_2 t} \quad (\text{Eq. 44})$$

Em que:

$S$  é a fração total de sobreviventes ( $x/x_0$ ) no tempo  $t$ ;

$f$  é a fração de sobreviventes da subpopulação 1, mais sensíveis;

$(1 - f)$  é a fração de sobreviventes da subpopulação 2, caracterizada pelos microrganismos menos sensíveis;

$b_1$  é a taxa de morte específica da subpopulação 1; e

$b_2$  é a taxa de morte específica da subpopulação 2.

b) Modelo de morte de uma população e crescimento de outra. Resposta mista pode ser observada quando são utilizadas substâncias bactericidas e bacteriostáticas. E ocorre quando uma cultura de células é somente parcialmente danificada ou quando recupera da lesão durante um período de armazenamento e retoma o crescimento. Um modelo apropriado deve considerar o crescimento, a inibição (lag) e morte. O modelo apresentado a seguir foi utilizado para descrever o declínio inicial no número de células seguido de recuperação e crescimento.

$$x = \frac{k}{1 + e^{-b \cdot (t - \tau)}} + x_{\text{dying}} \cdot e^{-\alpha t} \quad (\text{Eq. 45})$$

Em que:

$x$  é a população no tempo  $t$ ;

$k$  é a população máxima atingida pelas células;

$b$  é a taxa específica de crescimento máximo da população de células;

$\tau$  é o tempo em que o crescimento alcança  $x=k/2$ ;

$x_{\text{dying}}$  é a parte da subpopulação fatalmente danificada; e

$\alpha$  é a taxa específica de morte.

c) Modelo de morte de uma população, crescimento de outra e inibição de uma terceira. Esse modelo foi desenvolvido para explicar uma situação em foi observado que havia uma subpopulação de células que era inibida durante exposição a um agente e não

apresentava nenhum crescimento durante o período de ensaio. Contudo, era capaz de recuperar e, após 48 horas, ser obtida pelo método de contagem em placas.

$$x = x_{re\ cover} + \frac{k - x_{re\ cover}}{1 + e^{-b \cdot (t - \tau)}} + x_{dying} \cdot e^{-\alpha t} \quad (\text{Eq. 46})$$

Em que:

$x$  é a população no tempo  $t$ ;

$x_{re\ cover}$  é a fração da população que não cresce durante o experimento, mas recupera e cresce nas placas durante o ensaio;

$k$  é a população máxima atingida pelas células;

$k - x_{re\ cover}$ , no segundo termo garante que  $k$  representa a população de células que será alcançada;

$b$  é a taxa específica de crescimento máximo da população de células;

$\tau$  é o tempo em que o crescimento e  $x=k/2$ ;

$x_{dying}$  é a parte da subpopulação fatalmente danificada em morte; e

$\alpha$  é a taxa específica de morte.

Evidenciou-se, pelas informações, que enquanto o sistema APPCC atua no controle de processos, auxiliando na identificação de pontos críticos de controle, a microbiologia preditiva proporciona o entendimento da natureza do perigo e ajuda a estabelecer as prioridades de intervenções (NAUTA, 2001). Ambas as ferramentas constituem a base científica das ações que visam reduzir doenças que têm como causa a atividade microbiana em alimentos (FAO, 2006a). Associados, o sistema APPCC e a microbiologia preditiva oferecem estrutura para as ações que intensificam a segurança dos alimentos, uma vez que predizem os efeitos das intervenções nos processos de produção de alimentos (MILES; ROSS, 1999; NAUTA, 2002); .

Além disso, modelar o efeito da inativação microbiana por compostos químicos através do procedimento de sanitização dos alimentos é considerado um passo importante para melhorar os processos atuais de sanitização ou inovar em projetos futuros (VIRTO et al., 2005).

## 2.11. Análise quantitativa do risco

A Análise de Risco é outra ferramenta utilizada para a avaliação da segurança dos alimentos e do abastecimento de água. Estruturada em acordo com organizações de reconhecimento internacional como *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World*



*Health Organization* (WHO), têm como objetivos auxiliar no processo de tomada de decisão e estabelecer regulamentações e normas, fundamentando medidas de controle apropriadas aos riscos para a saúde e segurança alimentar. Deve ser adequada às considerações práticas de cada país, como o impacto econômico e facilidade de implantação (BUCHANAN; WHITING, 1996). Órgãos como FAO e WHO têm a importante tarefa de desenvolver e padronizar a análise de risco microbiológico internacional. É da competência deles passar as informações aos gestores do risco, tanto nacional quanto internacionalmente (FAO, 2003).

A realização de uma Análise do Risco Microbiológico, particularmente quantitativa, é reconhecida como uma tarefa intensiva que requer uma abordagem multidisciplinar.

### **2.11.1. Princípios da análise de risco**

- a) É um processo estruturado, composto de três componentes: avaliação do risco, gestão do risco e comunicação do risco.
- b) Deve estar fundamentada em dados científicos disponíveis.
- c) Deve apresentar consistência.
- d) Deve ser um processo aberto, transparente e totalmente documentado.
- e) Quando novas evidências científicas forem encontradas após a conclusão da análise, é necessário reavaliá-las e, quando indicado, fazer modificações.
- f) Devem ser consideradas e explicitadas claramente as incertezas e variabilidades (CAC, 2003).

Os resultados da análise de risco podem validar processos e estabelecer limites críticos para variáveis do processo. Dessa maneira, a análise de riscos constitui uma ferramenta para determinar prioridades, níveis de tolerância de um determinado risco e auxiliar na decisão sobre as medidas de controle, além de contribuir como fator quantitativo para sistemas de qualidade e APPCC (HOORNSTRA et al., 2001; SPERBER, 2001; BEMRAH et al., 2003).

### **2.11.2. Apresentação do Sistema de Análise de Risco**

O sistema está estruturado em fases independentes e inter-relacionadas como apresentado na Figura 5. A importância da sobreposição entre avaliação do risco, gestão do risco e comunicação do risco é reconhecida, assim como a necessidade de separação funcional. Quanto à avaliação do risco, tal separação assegura que os assuntos sejam tratados de maneira transparente, utilizando-se de bases científicas.

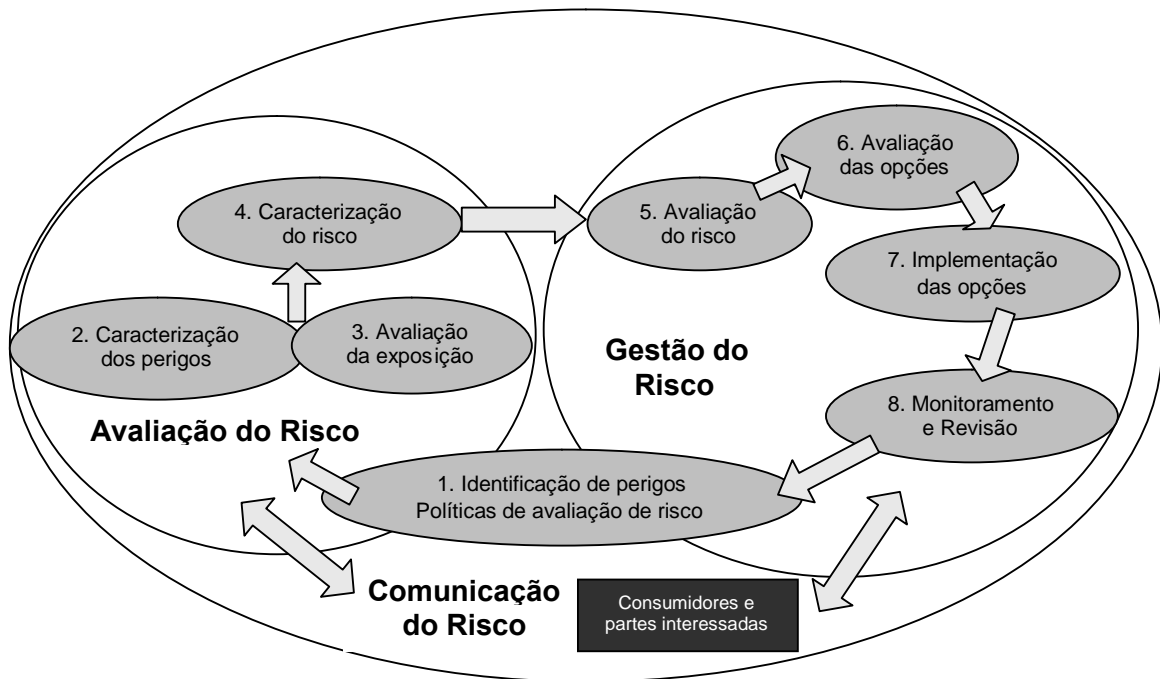


Figura 5 - Estrutura da análise de risco (SCHOTHORST, 2002).

### 2.11.2.1. Avaliação do Risco

Consiste em uma análise científica das condições que representam risco à saúde pública. Seu objetivo é determinar o grau de risco associado a determinado alimento em particular, por meio de avaliações quantitativas e qualitativas.

Existem quatro passos no processo de avaliação de risco (Figura 6):

#### 1) Identificação do perigo

É a metodologia descrita no primeiro passo do sistema APPCC. Durante a identificação de perigos, a relação entre o perigo microbiano e certos grupos de alto risco pode ser identificada na população.

A identificação envolve a coleção, organização e avaliação de toda a informação pertinente (SCHOTHORST, 2002).

#### 2) Caracterização do perigo

É uma avaliação quantitativa ou qualitativa da natureza e dos efeitos à saúde associados com o perigo. Para propósitos da Análise do Risco Microbiológico, os problemas estão relacionados aos microrganismos ou suas toxinas têm na dose-resposta um importante aspecto da caracterização do perigo. A dose-resposta deve ser avaliada, se os dados permitirem (SCHOTHORST, 2002).

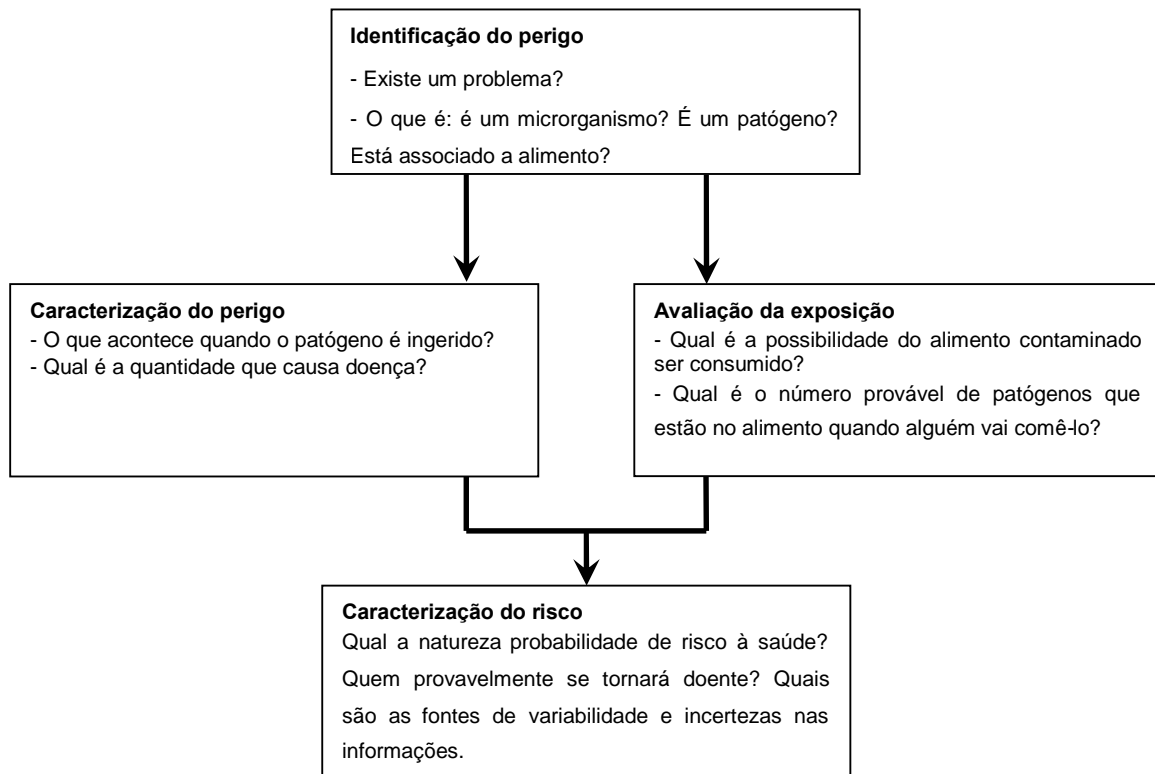


Figura 6 - Representação esquemática dos passos da avaliação do risco (SCHOTHORST, 2002).

### 3a) Avaliação da exposição ao perigo

Direcionada ao consumidor, é uma avaliação qualitativa e, ou, quantitativa do provável consumo de um perigo microbiano por alimentos que tem potencial de causar efeito adverso à saúde. Envolve a determinação de estimativas, qualitativa ou quantitativa, da probabilidade e do nível do patógeno que pode ser ingerido por uma pessoa em uma porção de alimento ou volume de água. Pode, também, identificar a frequência e a quantidade de alimento e água consumidos em certo período por uma população ou subpopulação, e pode combinar as informações para estimar a exposição da população ao perigo, através da água ou de alimentos negociados em transações comerciais internacionais (SCHOTHORST, 2002; WHO, 2008).

### 3b) Dados para avaliação da exposição

**Dados sobre manipulação de alimentos:** existe, relativamente, pouca informação disponível sobre manipulação em restaurantes e serviços de alimentação, inclusive, comidas de rua, locais estes com crescente proporção de refeições em muitos países.

**Dados sobre hábitos de consumo:** são necessárias informações sobre o comportamento do consumidor e dados acerca dos padrões de consumo. É preciso conhecer a quantidade de alimento consumida e a frequência com que o alimento é

consumido. O consumo de um alimento varia de acordo com a localização geográfica, etnicidade, sexo e educação (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

#### **4a) Caracterização do perigo**

Fornece uma descrição dos efeitos adversos que podem resultar da ingestão de um microrganismo e a relação de dose-resposta, caso haja dados disponíveis.

#### **4b) Caracterização do risco**

É o processo usado para determinar as estimativas, incluindo as incertezas, a probabilidade de ocorrência e severidade dos efeitos conhecidos, adversos e potenciais, em dada população, integrando os três passos anteriores, identificação do perigo, caracterização do perigo e avaliação da exposição ao perigo. Envolve a avaliação do risco e as informações relacionadas a este processo (SCHOTHORST, 2002).

O processo de avaliação do risco é uma forma de identificar a estimativa da probabilidade e severidade de uma doença atribuída à combinação patógeno e alimento.

O processo descreve, do ponto de vista biológico, o destino do perigo e do alimento durante as fases intermediárias da cadeia produtiva. A fase de consumo deve estar explícita, porque a quantidade consumida do alimento faz parte da avaliação da exposição. Então, se os dados do comportamento do consumidor forem escassos e simples suposições têm que ser feitas, estas serão as principais fontes de incertezas da modelagem (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

### **2.11.2.2. Gestão do risco**

É realizado por organismos oficiais de vigilância sanitária. Utilizam-se dos resultados da avaliação dos riscos para analisar as melhores alternativas de controle do risco até níveis aceitáveis, bem como das condições econômicas, possíveis relações de custo-benefício, entre outros fatores, para adotar decisões e estabelecer quais as medidas regulamentares são requeridas (SCHLUNDT, 1999). Desenvolvem-se alternativas baseadas no impacto que terão nas partes interessadas, como produtores primários, processadores de alimentos, varejistas, consumidores e governo (FAO, 2004).

### **2.11.2.3. Comunicação do risco**

É um processo interativo de troca de informações e opiniões sobre riscos, entre avaliadores e gestores governamentais de risco, para segurança alimentar e demais partes interessadas, como representantes dos consumidores, indústrias e instituições de pesquisa e de ensino. São discutidas as alternativas para harmonização legal ou

institucional da gestão do risco e garantir que as informações e opiniões requeridas para uma gestão efetiva do risco sejam incorporadas ao processo de tomada de decisão (FAO, 2004).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

#### **3.1. Caracterização da superfície da alface**

##### **3.1.1. Amostras de alface**

A alface lisa, da variedade Vitória de Santo Antão, foi adquirida em um mercado local da cidade de Viçosa, MG. Foi colocada em sacos plásticos esterilizados e armazenada em caixas isotérmicas com gelo reciclável, durante o transporte ao LHMA. No laboratório, foi retirada da caixa isotérmica e armazenada em refrigerador doméstico à temperatura de  $7,0\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , por 12 h antes dos experimentos. As folhas externas e centrais foram descartadas com o auxílio de uma faca esterilizada. Foram escolhidas para o estudo as folhas internas íntegras, verde-claras.

##### **3.1.2. Adesão de *Escherichia coli* O157:H7 em folhas de alface**

###### **a) Preparo das amostras de alface**

As folhas de alface foram lavadas em água corrente para remoção de sujidades visíveis. Em seguida, foram tratadas com solução sanitizante preparada a partir de dicloroisocianurato de sódio (Nippo-clor), com cloro residual livre na concentração de  $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e pH 6,1, por 15 min. Após o tempo de contato, foram retiradas da solução sanitizante e submergidas, por 1 minuto, em solução neutralizante de tiosulfato de sódio 0,5 % (p/v) e transferidas para um saco plástico perfurado mantido suspenso, por 20 min, para escoamento de água. A fim de observar a contaminação natural, as folhas foram lavadas com água destilada esterilizada e drenadas, por 20 min e colocadas sobre uma tábua de corte com o auxílio de uma pinça. Da região central e das bordas da folha foram

cortados cupons de 1 cm x 1 cm com ajuda de uma lâmina cirúrgica. Todo material que entrou em contato com a alface, por exemplo, recipientes, utensílios, lâminas e água foram esterilizadas em autoclave a 121 °C, por 15 min, e utilizados resfriados a 22 °C, aproximadamente. A alface e os utensílios foram manipulados sob técnicas assépticas.

#### **b) Preparo do inóculo**

A suspensão de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 foi obtida a partir de cultura fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro) e preservada a -85 °C em caldo de cérebro e coração (Merck®) e glicerol na proporção de 20% (v/v) no LHMA/DTA/UFV. A cultura foi ativada em caldo nutriente (Oxoid®) e incubada na temperatura de 35 °C ± 2 °C em condições estáticas. A cultura de células foi centrifugada a 12.000 *g*, por 2 min. O concentrado de células foi lavado com água destilada esterilizada por duas vezes, sendo o inóculo preparado pela suspensão do concentrado de células em água destilada esterilizada. Uma alíquota de 1 mL da suspensão do inóculo foi retirada, asépticamente, e foram realizadas diluições decimais seriadas. Alíquotas de três diluições mais altas foram inoculadas em ágar MacConkey (Acumedia®) incubadas a 37 °C, por 24 h. Após esse período, enumeraram-se as colônias e foram quantificados os números de UFC·mL<sup>-1</sup> de inóculo. A suspensão de células foi usada imediatamente para inocular os cupons de folhas de alface.

#### **c) Inoculação das alfaves**

Seis cupons da folha de alface tratada foram submersos na suspensão de 7,78 log UFC·mL<sup>-1</sup> de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895. Como controle, outros seis cupons foram submersos em água destilada esterilizada. Os cupons foram mantidos a 7 °C ± 1 °C por 24 h ± 2 h, em condições estáticas.

#### **d) Preparo da amostras para avaliação da adesão e observação no microscópio eletrônico de varredura (MEV)**

Três cupons de cada amostra foram separados para as análises de microscopia e mais três, para a determinação da adesão. Os cupons imersos na suspensão de células de *E. coli* O157:H7 foram removidos da suspensão e rinsados duas vezes em água peptonada 0,1% (p/v) esterilizada para remoção de células planctônicas ou fracamente aderidas. Cerca de 1 mm dos tecidos das extremidades de cada cupom inoculado foi removido com uma lâmina esterilizada, obtendo-se quatro situações a serem observados: (i) as extremidades cortadas dos cupons inoculados, (ii) as porções internas dos cupons inoculados; (iii) controle, cupom da folha sanitizada e sem adesão; e, (iv) folha natural, sem tratamento de descontaminação.

As células aderidas às superfícies da alface foram fixadas com solução de glutaraldeído na concentração de 3,0% (v/v) e tampão fosfato 0,05 mol·L<sup>-1</sup>, pH entre 6,8 e 7,2, sendo mantidas à temperatura de 25 °C, por uma hora. Em seguida, as amostras foram lavadas por quatro vezes, em intervalos de 15 min, no mesmo tampão. As amostras foram desidratadas em solução aquosa de álcool etílico nas concentrações de 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v) e 95% (v/v), durante 15 min de contato em cada concentração e, finalmente, em álcool etílico P.A. 100% (v/v), com duas imersões de 15 min. As amostras foram transferidas para cestos permeáveis do equipamento secador de ponto crítico (*Critical Point Dryer* - CPD Bal-tec 030) com CO<sub>2</sub> líquido, para evaporação do álcool utilizado para desidratação, protocolos de acordo com Bozzola e Russel (1991).

As amostras secas foram fixadas nos porta-espécimes (*stubs*) com fita dupla-face de plástico. As amostras dessecadas foram introduzidas no metalizador para serem cobertas por um filme de ouro na espessura de 15 a 25 nm pelo processo de pulverização catódica, em equipamento Balzers de congelamento a seco (FDU 010), acoplado ao conjunto de pulverização catódica (modelo SCA 010). A observação e a documentação fotográfica foram realizadas com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura (LEO, 1430 VP), sob alta voltagem. As amostras foram analisadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa.

#### **e) Avaliação da adesão de *Escherichia coli* O157:H7 aos cupons de alface**

Os cupons das amostras, inoculadas e não inoculadas (controle), foram separados para análises microbiológicas. Cada cupom foi enxaguado em água peptonada 0,1% (p/v) por um minuto para remoção de células planctônicas ou fracamente aderidas. Em seguida, foi removido, assepticamente, de cada cupom inoculado cerca de 1 mm da beirada com o auxílio de uma lâmina esterilizada. As beiradas de cada cupom foram transferidas, separadamente, para um frasco de tampa rosqueável contendo 10 mL de água peptonada 0,1% (p/v) esterilizada. O mesmo foi feito com cada uma das partes centrais do cupom e com cada cupom sem adesão, que foram transferidos íntegros para os tubos.

As amostras foram agitadas em *vortex*, na velocidade alta, em 2 ciclos de 2 min cada. Usando 1 mL do homogenato, prepararam-se diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) esterilizada. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram plaqueadas em duplicata pela técnica profundidade em ágar MacConkey. Inverteram-se as placas, incubando-as a 35 °C, por 24 h, sendo as colônias enumeradas.

A adesão da *E. coli* O 157:H7 a cada cupom foi estimada, quantitativamente, pelas médias das contagens, sendo os resultados expressos em log UFC·cm<sup>-2</sup>.



## 3.2. Avaliação dos hábitos de consumo da população usuária dos restaurantes

### 3.2.1. Aplicação de questionários

A coleta dos dados foi realizada entre agosto e setembro de 2006. De acordo com dados da Secretaria Municipal de Saúde, da Prefeitura Municipal de Viçosa, MG, havia, naquela época, 46 restaurantes do tipo autosserviço por peso no município. Deste total, os proprietários de sete estabelecimentos (15,2%) concordaram em colaborar com a pesquisa.

Trezentas folhas com as questões a serem respondidas foram entregues aos usuários dos restaurantes no momento da pesagem da refeição. Uma caneta foi disponibilizada em cada mesa para facilitar o preenchimento. O seguinte questionário foi aplicado aos usuários.

Pesquisa: Consumo de alface em restaurantes na cidade de Viçosa, MG.	
Data: ____/____/2006	
1 - Idade: _____	Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>
2 - Quantidade de alface consumida:	
a) Porção	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	P M G
b) Quantas vezes por semana você almoça em restaurante <i>self-service</i> ?	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
0	1 2 3 4 5 6 7
c) Quantas vezes por semana você consome alface?	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
0	1 2 3 4 5 6 7
3 - Você lava as mãos antes das refeições? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
4 - Ocorrências de diarreia	
a) Você teve diarreia recentemente? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
b) Você sabe o que causou a diarreia? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
c) Você procurou serviços de saúde para tratamento? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	

Os dados coletados das folhas de respostas preenchidas pelos usuários dos restaurantes foram organizados e classificados. Posteriormente, foram analisados por métodos estatísticos descritivos.

Tabelas foram estruturadas com as frequências das respostas para cada item respondido pelos usuários. A partir desses valores, construíram-se os gráficos relacionando as classificações com porcentagens de respostas e o item avaliado. A análise dos dados foi realizada com o auxílio do *software Statistical Package for the Social Science (SPSS)*, versão 14.0 for *Windows*.

### **3.2.2. Determinação do tamanho das porções**

O tamanho das porções foi determinado, primeiramente, por meio da observação do volume de salada de alface servido pelo cliente ao utilizar um pegador de salada padrão. Para determinação do peso, porções de alface com tamanhos similares às observadas foram pesadas em uma balança de precisão com o auxílio do mesmo pegador padrão. Realizaram-se 10 pesagens para cada tamanho de porção. Pela média das pesagens determinou-se o peso final delas. Foram classificadas como porções pequenas, médias e grandes.

## **3.3. Avaliação das condições higiênicas do processamento nos restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, MG**

### **3.3.1. Avaliação da qualidade microbiológica do ar dos ambientes de processamento**

Os ambientes de preparo e de distribuição de saladas dos restaurantes foram avaliados pela técnica de sedimentação simples, de acordo com o proposto pela APHA (EVANCHO et al., 2001). Esta técnica consistiu na exposição de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo ágar padrão para contagem de microrganismos – PCA (Acumedia®) para determinação de mesófilos aeróbios e ágar batata dextrose acidificado – BDA (Merck®) para determinação de fungos filamentosos e leveduras, pelo tempo de 15 min. Duas amostras foram coletadas em cada uma das três visitas, nos dois ambientes avaliados, perfazendo um total de 84 amostras.

O período de amostragem nos restaurantes ocorreu durante atividades de preparo do almoço, ou seja, entre 7 h e 14 h, em semanas diferentes. Após o tempo de exposição ao ar dos ambientes avaliados, as placas foram fechadas e transportadas para o laboratório, armazenadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável. Para o cultivo dos microrganismos mesófilos aeróbios, as placas foram invertidas e incubadas a 35 °C, por 48 h. No cultivo de fungos filamentosos e leveduras, foram incubadas a 25 °C, por 72 h. Após o período de incubação, as colônias que cresceram nas placas foram enumeradas. As médias das contagens foram utilizadas para calcular os resultados, que foram expressos em  $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{semana}^{-1}$  com o auxílio da seguinte equação:

$$\text{Partículas viáveis}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1} = \frac{UFC.10080^*}{\pi.r^2.t} \quad (\text{Eq. 47})$$

Em que:

r é o raio da placa de Petri, em cm;

10080\* é o número de minutos de uma semana;

$\pi$  é 3,1415; e

t é o tempo de exposição da placa de Petri, em minutos.

### 3.3.2. Avaliação microbiológica das mãos de manipuladores de alimentos

Foi submetido à avaliação microbiológica pelo menos um manipulador responsável pelo processamento de saladas em cada restaurante. Os microrganismos foram removidos das mãos consideradas higienizadas pelo próprio manipulador. Para isso foram utilizados *swabs* de algodão não absorvente de 0,5 cm de diâmetro por 2 cm de comprimento ajustado em uma haste de madeira de 12 cm de comprimento, preparados conforme técnica descrita pela APHA (EVANCHO et al., 2001) e esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 min, antes do uso.

Os microrganismos da superfície das mãos foram removidos com o *swab* umedecido no diluente e, friccionado em ângulo 30°, com a superfície da palma e das bordas da mão. O *swab* partiu dos punhos com movimentos giratórios, passou pela parte inferior da palma até a extremidade dos dedos, voltando ao punho. O procedimento foi repetido três vezes na direção de cada dedo. Os movimentos nas bordas foram do tipo vai-e-vem, de modo a avançar em um dos lados da mão onde as linhas dos punhos se iniciavam, passando depois entre os dedos e, no final, no outro lado da mão encontrando-se de novo com as linhas dos punhos.

Em seguida, os *swabs* contendo os microrganismos aderidos foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 10 mL de tampão fosfato esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 min. Após as coletas, os tubos contendo as amostras foram transportados ao laboratório sob refrigeração sendo as análises realizadas no mesmo dia da coleta.

Cada *swab* foi agitado em um *vortex* por dois minutos. Foram retiradas, com auxílio de pipetas esterilizadas, alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL e inoculadas no meio de cultivo adequado para cada tipo de microrganismo investigado. Para o cultivo de mesófilos aeróbios, as alíquotas foram inoculadas em PCA e incubadas a 35 °C, por 24 h. No caso de cultivo de fungos filamentosos e leveduras, inocularam-se as alíquotas em BDA e as placas foram incubadas a 25 °C, por 72 h. Na determinação de coliformes, as

alíquotas foram inoculadas em ágar Vermelho Violeta Bile (Merck®) e incubadas a 45 °C, por 24 h.

Realizaram-se duas coletas em cada restaurante, sendo as análises feitas em duplicata. Os resultados foram expressos em log UFC/mão.

Os resultados dessa avaliação foram classificados nas seguintes faixas: < 2 log UFC/mão; < 3 log UFC/mão; < 4 log UFC/mão e > 4 log UFC/mão. Definiram-se, considerando a inexistência de padrões ou especificações para as contagens microbianas em mãos de manipuladores (SILVA, 1996).

### **3.3.3. Avaliação microbiológica dos equipamentos e utensílios**

Avaliaram-se equipamentos e utensílios utilizados durante preparo e acondicionamento da alface. Para esta avaliação, os microrganismos foram removidos das superfícies consideradas higienizadas pela técnica do *swab*, conforme recomendação da APHA (EVANCHO et al., 2001). Utilizou-se *swab* de algodão não absorvente, de 0,5 cm de diâmetro e 2 cm de comprimento, fixados em uma haste de madeira de 12 cm de comprimento. Os *swabs* foram esterilizados em autoclave a 121 °C, por 15 min.

Para a remoção dos microrganismos, o *swab*, umedecido no diluente, foi friccionado em um ângulo de aproximadamente 30° com a superfície, por três vezes no sentido vai-e-vem, da esquerda para a direita, numa área delimitada por um molde esterilizado de 2 cm x 25 cm. Em seguida, os microrganismos coletados foram transferidos para tubos de ensaio, contendo 10 mL de solução neutralizante de tiosulfato de sódio a 0,25% em solução Ringer 1:4, de pH 7,0, esterilizada em autoclave a 121 °C, por 15 min. O *swab* foi imerso na solução e pressionado contra a superfície do tubo para remoção do excesso de solução. Este mesmo *swab* foi utilizado para coletar microrganismos em outra área de 2 cm x 25 cm do mesmo utensílio e novamente foi transferido para o mesmo tubo de ensaio. Esse procedimento foi repetido por cinco vezes, totalizando uma área de 250 cm<sup>2</sup> por equipamento. Quando havia dificuldades na determinação dessa área nos equipamentos, foram feitas estimativas, sendo as coletas efetuadas sempre da mesma forma.

Após a última coleta, o *swab* foi introduzido no tubo. A parte manuseada de sua haste foi quebrada na borda interna do tubo do diluente, antes de o material amostrado ser mergulhado.

Os tubos contendo as amostras foram transportados ao laboratório, sob refrigeração, e as análises realizadas no mesmo dia da coleta. Cada *swab* foi agitado em um *vortex* pelo tempo de 2 min. Com o auxílio de pipetas esterilizadas foram retiradas

alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL e inoculadas no meio de cultivo adequado para cada tipo de microrganismo investigado. Para o cultivo de mesófilos aeróbios, as alíquotas foram inoculadas em PCA e incubadas a 35 °C, por 48 h. No cultivo de fungos filamentosos e leveduras, as alíquotas foram inoculadas em BDA, e as placas incubadas a 25 °C, por 72 h. Na determinação de coliformes, as alíquotas foram inoculadas em ágar VRB incubadas a 35 °C, por 48 h.

Os resultados foram expressos em logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por cm<sup>2</sup> de superfície (UFC·cm<sup>-2</sup>).

### **3.4. Microbiota da alface do campo à mesa**

#### **3.4.1. Planejamento para as coletas de amostras de alface**

Amostras de alfaces foram coletadas no campo, durante a colheita, no momento da entrega ao restaurante e após o preparo para consumo. A data e os horários das coletas foram previamente planejados com o produtor rural e proprietários dos restaurantes. As caixas contendo as alfaces foram identificadas para garantir que essas pertenciam a um mesmo lote.

**Método da coleta das amostras no campo:** a coleta das amostras no campo ocorreu no período da tarde, no dia anterior à entrega aos restaurantes. Os pés de alface foram colhidos na propriedade rural, diretamente dos canteiros. As amostras foram apanhadas com mãos higienizadas, cobertas com luvas e com o auxílio de uma faca esterilizada. Escolheram-se três unidades aleatoriamente dentre as que pertenciam ao mesmo lote colhido, para abastecer o restaurante. As raízes foram removidas, e as amostras transferidas para sacos de polietileno esterilizados e foram mantidas em caixas de isopor com gelo durante o transporte ao laboratório. As análises foram realizadas no mesmo dia da colheita da alface. Assepticamente, removeram-se as folhas centrais pequenas e verde-claras e algumas folhas externas. Foram coletadas duas amostras de 25 g de cada pé de alface.

**Método da coleta de amostras entregues nos restaurantes:** essas amostras foram coletadas na manhã do dia seguinte à colheita, dentre as alfaces que chegaram ao restaurante. Coletaram-se três unidades diretamente das caixas de entrega do produtor rural, sendo transferidas individualmente para sacos plásticos esterilizados. As amostras permaneceram em caixas de isopor com gelo durante o transporte para o laboratório. Sob técnicas assépticas, as folhas centrais foram removidas e descartadas e, com o auxílio de uma pinça, as amostras das folhas apropriadas para consumo foram coletadas por toda volta do pé de alface.

**Método da coleta de amostras prontas para consumo:** essas amostras foram constituídas de folhas de alface após passarem pelas etapas de limpeza, sanitização, corte e acondicionamento. Foram coletadas sob práticas assépticas antes do início da distribuição aos clientes utilizando-se pinças e sacos plásticos esterilizados. Foram mantidas em caixas de isopor com gelo durante transporte até o laboratório. Realizaram-se as análises no mesmo dia da coleta.

Três amostras foram analisadas em cada repetição, sendo o experimento repetido três vezes.

### **3.4.2. Medida da temperatura das alfaces**

A temperatura, expressa em graus Celsius (°C), foi medida durante as etapas de entrega e, logo após o processamento, com um termômetro digital (LCD digital Multi-System, Alemanha). Após limpeza e assepsia com álcool 70% (v/v), o termômetro foi introduzido em cada unidade de alface entregue ao restaurante. Na alface pronta para consumo, o termômetro foi introduzido na cuba contendo a alface preparada, sem tocar o fundo ou as laterais do recipiente.

### **3.4.3. Realização das análises microbiológicas das amostras de alface**

As amostras foram transferidas, assepticamente, para um saco plástico esterilizado e pesadas em porções de 25 g em balança analítica. Foram adicionados à amostra 225 mL de água peptonada 0,1%. A embalagem foi fechada e a amostra introduzida no homogeneizador de amostras (Marconi, modelo MA 440/CF) e homogeneizada por 2 min à velocidade máxima. Foi retirado, assepticamente, 1 mL do homogenato e foram realizadas diluições decimais. Da amostra do campo foram analisadas alíquotas de 1 mL das três diluições mais altas ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ). Das amostras da entrega e do restaurante foram analisadas alíquotas de diluições mais baixas ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Utilizou-se o método de plaqueamento em profundidade para enumeração de mesófilos aeróbios, em PCA; fungos filamentosos e leveduras, em BDA acidificado. Os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* foram cultivados em ágar MacConkey (Acumedia®) e os coliformes totais e *Escherichia coli* cultivados em placas Petrifilm™, usadas de acordo com as instruções do fabricante.

Após solidificação do meio de cultura, placas foram incubadas de acordo com a temperatura ótima de crescimento dos microrganismos. Os microrganismos mesófilos aeróbios, enterobactérias, coliformes totais e *E. coli* foram incubados à temperatura de  $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  por 24 h a 48 h. Fungos filamentosos e leveduras foram incubados a  $25\text{ °C}$ , por 72 h. Após crescimento enumeraram-se as colônias. Os resultados foram expressos em

logaritmo do número das Unidades Formadoras de Colônias por grama de alface ( $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

#### **3.4.3.1. Isolamento e identificação de enterobactérias**

Foram selecionadas colônias de morfologias distintas que cresceram no ágar MacConkey, como as de cor vermelha, indicando que fermentam lactose e, também, as sem cor, indicando que não fermentam lactose. Essas colônias isoladas foram transferidas assepticamente para caldo nutriente (Oxoid<sup>®</sup>) e incubadas a  $35 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ , por 24 h. As culturas foram reisoladas pela técnica de estrias compostas em ágar MacConkey e, novamente, transferidas para caldo nutriente e cultivadas a  $35 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ , por 24 h. Cada tubo foi agitado e uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da cultura do isolado cultivada em caldo nutriente foi transferida para tubos de tampa apegada, esterilizados e identificados. A cultura foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O concentrado de células foi lavado uma vez com água destilada esterilizada e o sobrenadante descartado. Os isolados foram ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de caldo Infusão de Cérebro e Coração (caldo BHI, Acumedia<sup>®</sup>), contendo 20% (v/v) de glicerol como crioprotetor e estocados à temperatura de  $-85 \text{ °C}$ .

Para identificação, as culturas criopreservadas foram descongeladas e as alíquotas inoculadas em caldo BHI, mantidas a  $35 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ , por 24 h. Após esse tempo, uma alça da cultura ativa foi novamente transferida para caldo BHI fresco e cultivada nas mesmas condições. A cultura ativa, estriada no ágar nutriente (Oxoid<sup>®</sup>) inclinado, foi incubada a  $35 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ , por 24 h, para obtenção de massa celular. A morfologia e o arranjo das células, coradas de acordo com a técnica de coloração de Gram, foram observados em microscópio ótico.

A produção da enzima catalase foi confirmada pela adição de gotas de peróxido de hidrogênio (Merck<sup>®</sup>) 10% sobre as colônias. Foram depositadas 2 gotas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fresca sobre uma placa de Petri vazia. Com a alça de platina foi retirada uma porção de massa celular e transferida para as gotas de água oxigenada. Foi observada a produção e liberação de  $\text{O}_2$ , evidenciado pela formação de bolhas.

A presença do citocromo oxidase foi detectada pelo teste da oxidase. Com o auxílio da alça de platina, a cultura foi espalhada sobre uma tira de papel-filtro. Duas gotas do reagente da oxidase foram colocadas sobre a cultura e observadas mudanças de cor, para interpretação do resultado. O aparecimento da cor azul escura indica positivo para oxidase e, nesse caso, a bactéria em estudo pertence à família *Pseudomonadaceae*, que são aeróbias estritas. Uma coloração rósea indica oxidase negativa, sugerindo tratar-se de enterobactéria.

Para realização dos testes bioquímicos, uma pequena quantidade de massa de células do microrganismo a ser identificado foi coletada com o auxílio de uma alça de platina. As células foram transferidas para uma ampola contendo 5 mL de meio de suspensão do sistema de identificação de enterobactérias e outros bacilos Gram-negativos não fastidiosos, API 20E (Biomérieux®). Após inoculação, a ampola foi cuidadosamente homogeneizada, com o auxílio do *vortex*. A suspensão bacteriana, utilizada imediatamente, foi introduzida nos tubos das galerias com a ajuda de pipeta de Pasteur esterilizada. Os isolados foram identificados pelo sistema API 20E para identificação de enterobactérias e outros bacilos Gram-negativos não fastidiosos (Quadro 1). Para os testes CIT, VP e GEL, os tubos e as cúpulas foram preenchidos. Para os testes ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S e URE, foi criada anaerobiose preenchendo a cúpula com óleo de parafina. A caixa foi incubada a 35 °C ± 2 °C por 24 h antes da leitura dos resultados. Os resultados foram revelados pela viragem de cor das reações espontâneas ou pela adição de reagentes, como os testes da triptofano desaminase (TDA), teste da produção do indol (IND), e o teste da produção da acetoina (VP).

Os microrganismos foram identificados a partir de um perfil numérico. Registraram-se os números foram introduzidos em uma planilha disponibilizada pelo programa *apiweb*. Resultados que apresentaram índice de confiabilidade menor que 80% foram considerados inaceitáveis. Realizaram-se os procedimentos de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante.

Após identificação, as bactérias foram listadas e foi determinada a incidência delas nas amostras das alfaces coletadas no campo, no momento da entrega aos restaurantes e após o processamento.

#### **3.4.4. Análise de perigos microbiológicos na cadeia de produção de alface distribuída para consumo nos restaurantes comerciais do município de Viçosa, MG**

A análise de perigos do sistema APPCC foi utilizada como ferramenta para auxiliar na decisão sobre as enterobactérias encontradas na alface Vitória de Santo Antão na cadeia do campo à mesa.



Quadro 1 - Sigla dos testes bioquímicos, enzimas e reações do sistema de identificação de enterobactérias API 20E

Siglas	Enzimas	Reações
ONPG	$\beta$ galactosidase	Hidrolisa orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo com liberação do ortonitrofenol, de cor amarela.
ADH	Arginina di-hidrolase	Transforma a arginina em ornitina, amônia e dióxido de carbono. Há aumento de pH e mudança do indicador de amarelo para vermelho.
LDC	Lisina descarboxilase	Transforma a lisina em cadaverina. Há aumento de pH e mudança do indicador de amarelo para vermelho.
ODC	Ornitina descarboxilase	Transforma a ornitina em putrescina. Há elevação do pH e mudança do indicador de amarelo para vermelho.
CIT	Utilização de citrato	A utilização do citrato resulta na elevação do pH e mudança do indicador de verde para azul.
H <sub>2</sub> S	Produção de H <sub>2</sub> S	O ácido sulfídrico é produzido a partir do tiosulfato. Ao reagir com os sais de ferro produz um precipitado negro.
URE	Urease	A urease libera amônia a partir da ureia; o pH eleva e o indicador muda de amarelo para vermelho.
TDA	Triptofano desaminase	A partir do triptofano a enzima forma o ácido indolpirúvico, que produz uma cor castanha na presença do cloreto férrico.
IND	Produção de indol	O metabolismo do triptofano resulta na formação de indol. O reagente de Kovacs forma um complexo corado (vermelho-rosa) com o indol.
VP	Produção de acetoina	A acetoina, um metabólito intermediário da fermentação butanodiólica da glucose, é produzida a partir de piruvato de sódio e evidenciada pela formação de um complexo corado.
GEL	Hidrólise da gelatina	A liquefação da gelatina é revelada pela difusão de um pigmento negro quando na presença do reagente de Kohn.
Provas do metabolismo de glicídios: GLU (Glicose); MAN (Manitol); INO (Inositol); SOR (Sorbitol); RHA (Ramnose); SAC (Sacarose); MEL (Melobiose); AMY (Amigdalina); ARA (Arabinose). A formação de ácidos e conseqüente baixa de pH faz o indicador mudar de azul para amarelo.		

Este processo foi conduzido com o auxílio do fluxograma apresentado na Figura 7, adaptado de Notermans, Zwietering e Mead (1994). Esse fluxograma apresenta uma seqüência de perguntas e processos que levam a concluir sobre a importância da presença de cada um dos microrganismos encontrados no alimento. Cada uma das 18

enterobactérias identificadas e isoladas em determinada etapa de processamento da alface foi submetida às questões descritas no fluxograma. A decisão sobre a classificação da enterobactéria como microrganismo potencialmente perigoso foi obtida com o auxílio da listagem compilada. Ao final de cada etapa do fluxograma, a enterobactéria classificada como um perigo potencial permaneceu na lista.

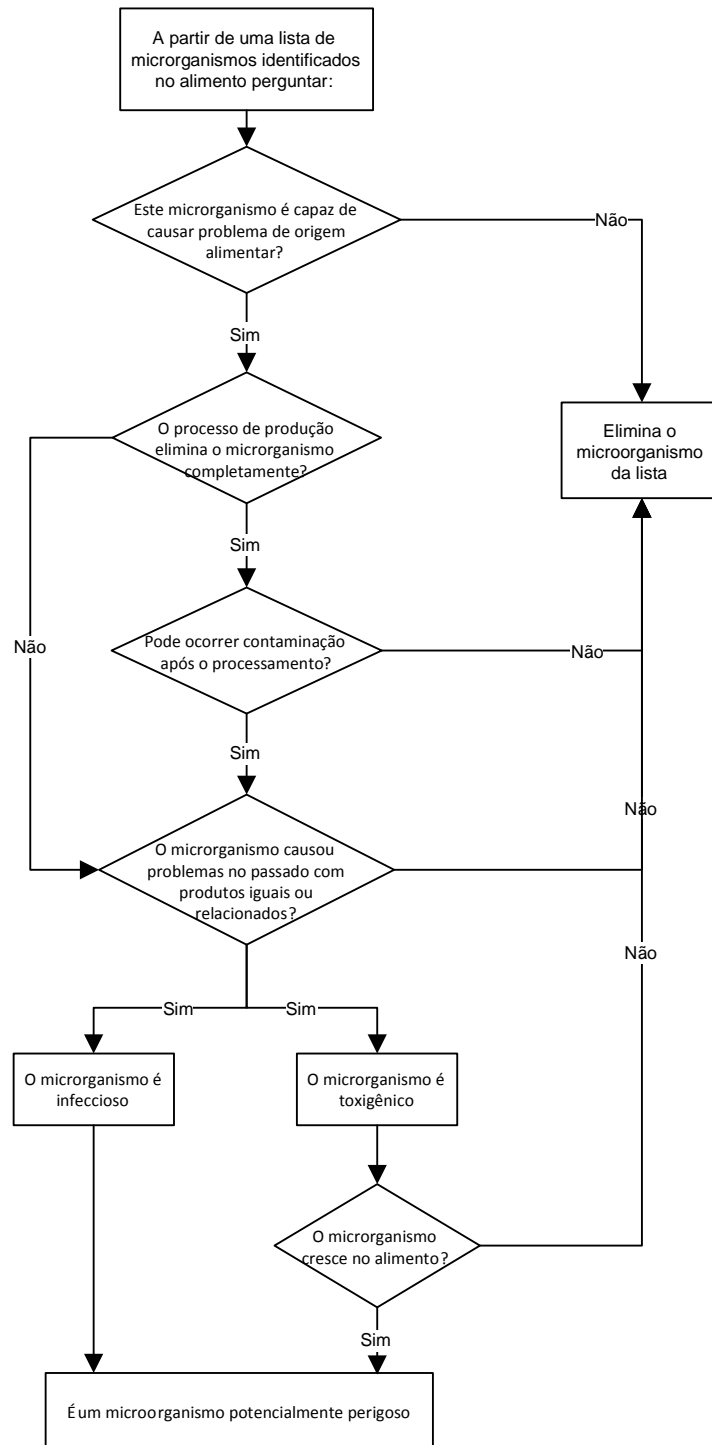


Figura 7 - Fluxograma da análise de perigos para auxílio na classificação de microrganismos potencialmente perigosos (NOTERMANS; ZWIETERING; MEAD, 1994).

Após identificação dos perigos potenciais, realizou-se uma revisão bibliográfica para aquisição de conhecimento e caracterização de suas competências fisiológicas. As bactérias consideradas perigos microbiológicos na cadeia da alface do campo à mesa foram selecionadas para a continuidade dos estudos da análise de perigos do sistema APPCC.

### **3.5. Determinação da concentração do princípio ativo das soluções sanitizantes utilizados nos restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, MG**

Observaram-se nos restaurantes diferentes soluções sanitizantes. Elas foram preparadas a partir de produtos comerciais, sendo uma cloramina orgânica e vinagre. Coletaram-se amostras de 200 mL das soluções e enviadas para LHMA/DTA/UFV para quantificação dos princípios ativos. A concentração do cloro residual total, expresso em  $\text{Cl}_2$  na solução da cloramina orgânica, foi determinada pelo método iodométrico (GREENBERG; CLESCERI; EATON, 1992). Este método consistiu na titulação de uma alíquota de 5 mL da amostra por uma solução padronizada de tiosulfato de sódio, sendo o final da titulação determinado pela viragem de cor azul, proveniente da reação entre amido e iodo, para incolor.

As concentrações do ácido acético foram determinadas pelo método da acidez total titulável, segundo AOAC (1994). Este método consistiu na titulação de uma alíquota de 5 mL da amostra por uma solução padronizada de NaOH, sendo o final da titulação determinado pela viragem de cor utilizando fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos em % de cloro residual total e % de ácido acético.

O pH das amostras foi determinado pelo método potenciométrico utilizando-se o potenciômetro digital (DM 20, Digimed), previamente calibrado com soluções-tampão no pH 4,0 e no pH 7,0.

As análises foram realizadas em triplicata. Obtiveram-se as concentrações dos princípios ativos nas soluções analisadas pelas seguintes equações:

Cloro Residual Total

$$\text{mg L}^{-1} \text{ CRT (Cl}_2\text{)} = V \times N \times \text{fc} \times \text{PE} \times 1000/V \text{ amostra} \quad (\text{Eq. 48})$$

$$\% \text{ de ácido acético} = V \times N \times \text{fc} \times \text{PE (CH}_3\text{COOH)} \times 100/5 \times 1/1000 \quad (\text{Eq. 49})$$

Em que:

V é o volume da solução padronizada gasto na titulação;

N é a normalidade da solução padronizada utilizada na titulação;

Fc é o fator de correção solução padronizada;  
PE é o peso equivalente do princípio ativo; e,  
V é o volume da amostra analisado.

### **3.6. Testes do desafio microbiológico**

#### **3.6.1. Eficiência de soluções de vinagre adicionado de cloreto de sódio sobre células planctônicas de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* avaliada pelo teste da suspensão**

##### **a) Preparo da suspensão de enterobactérias**

Foram utilizadas para essa pesquisa células de *E. coli*, *C. sakazakii* e *K. pneumoniae* isoladas da alface Vitória de Santo Antão prontas para consumo em restaurantes comerciais do município de Viçosa, MG. Preservaram-se os isolados à temperatura de -85 °C em caldo BHI e glicerol, na proporção de 20% (v/v), no LHMA/DTA/UFV. Antes da realização dos testes, as células das três bactérias foram descongeladas e ativadas por três transferências em caldo tripticase de soja (DIFCO®) à temperatura de 35 °C ± 2 °C, em condições estáticas, por 24 h. Após a terceira ativação, 1 mL da cultura foi transferido para tubos com tampa apegada (Eppendorf®) esterilizados e centrifugada a 12.000 g, por 2 min. O concentrado de células formado foi lavado com água peptonada 0,1% esterilizada e o procedimento repetido por duas vezes. O concentrado de células foi dissolvido e transferido para um tubo de 10 mL de água destilada esterilizada.

##### **b) Determinação da concentração inicial de células das enterobactérias testadas**

Determinou-se a concentração inicial de células na suspensão. Uma alíquota de 1 mL da suspensão foi retirada e decimamente diluída em 9 mL de água peptonada 0,1%. Alíquotas de 1 mL das diluições mais altas foram inoculadas em ágar MacConkey e incubadas a 37 °C, por 24 h. Após esse período, enumeraram-se as colônias sendo os resultados expressos em log UFC·mL<sup>-1</sup>.

##### **c) Preparo das soluções de vinagre adicionado de cloreto de sódio**

A partir de vinagre escuro comercial (Toscano, Jundiaí, SP) na concentração de 4,5% (v/v) de acidez expressa em ácido acético e pH 2,35 e do cloreto de sódio P.A. (ALDRICH®), foram preparadas as seguintes soluções: a) ácido acético 2% (v/v), pH 2,47; b) ácido acético 1,5% (v/v) + NaCl 0,5% (p/v), pH 2,59; c) ácido acético 1% (v/v) + NaCl

1% (p/v), pH 2,65; d) ácido acético 0,75% (v/v) + NaCl 1,75% (p/v), pH 2,80; e) NaCl 2% (p/v), pH 4,80.

Primeiramente, foram preparadas as soluções para diluição centesimal, salinas ou não, de acordo com as concentrações definidas. Para isso, o cloreto de sódio foi pesado em balança analítica e transferido para garrafas de diluições identificadas. A água destilada foi medida em proveta e transferida para as garrafas contendo o cloreto de sódio. Essas garrafas foram tampadas e agitadas manualmente até o cloreto de sódio ser dissolvido. Em seguida, foram esterilizadas em autoclave 121 °C, por 15 min. Foi definido para essa pesquisa que o vinagre não seria esterilizado. Sob técnicas assépticas a embalagem foi aberta e o vinagre medido volumetricamente e transferido para suas respectivas garrafas de diluição, que foram fechadas e agitadas manualmente.

No momento de realização dos testes, cada garrafa de diluição foi aberta e retirado 1 mL de solução pronta e descartado, ajustando-se o volume da solução testada para 99,0 mL.

#### **d) Preparo das soluções neutralizantes**

Foram preparadas soluções com 0,25% de tiosulfato de sódio e de 0,1% NaOH para serem utilizadas como neutralizantes das soluções cloradas e de ácido acético. Com auxílio de uma pipeta, foram transferidas 9 mL das soluções para tubos de tampas rosqueadas. O material foi esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 min.

#### **e) Realização do teste da suspensão**

Utilizando-se pipetadores automáticos, a alíquota de 1 mL da suspensão de células foi inoculada em 99 mL da solução sanitizante. O tempo de contato de 30 s foi marcado em cronômetro digital. Após esse tempo, uma alíquota de 1 mL foi retirada e transferida para um tubo contendo 9 mL da solução neutralizante e agitado.

#### **f) Determinação do número de sobreviventes**

A alíquota de 1 mL da solução neutralizante contendo os microrganismos foi transferida para tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v) para diluições decimais. Alíquotas de 1 mL das diluições escolhidas foram inoculadas, pelo método da profundidade, em placas de Petri vazias esterilizadas. Ágar padrão para contagem foi utilizado como meio de cultivo. As placas foram incubadas a 35 °C ± 2 °C, por 24 h. Enumeraram-se as colônias, sendo os resultados expressos em Log UFC.g<sup>-1</sup>.

### **3.6.2. Avaliação da eficiência da água e de soluções sanitizantes em reduzir populações de células de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* aderidas à alface**

#### **a) Preparo da suspensão de enterobactérias**

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.6.1 a. Para serem inoculadas nas alfaces, as suspensões de células foram diluídas para que o número atingisse  $6 \log \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### **b) Preparo da alface para contaminação intencional**

A alface foi adquirida em mercado local da cidade de Viçosa, MG e transportada para o LHMA/DTA/UFV. Removeram-se e descartaram-se as folhas externas e centrais. Utilizaram-se folhas internas íntegras, que tiveram peso ajustado para 10 g. Foram lavadas em água corrente e sanitizadas com uma cloramina orgânica na concentração de  $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  expressos em CRT e pH 6,5, com tempo de contato de 15 min. O cloro foi inativado com solução de tiosulfato de sódio 0,5% (p/v), por 1 min. As folhas, enxaguadas duas vezes em água esterilizada, para remoção do tiosulfato, foram transferidas para sacos plásticos esterilizados perfurados e drenadas por uma hora, na temperatura de 4 °C.

O número de unidades amostrais a serem preparadas para cada microrganismo testado foi informado pelo planejamento experimental. Os experimentos foram realizados em blocos casualizados. Cada bloco consistiu de quatro tratamentos aplicados a duas amostras. Portanto, foram necessárias oito amostras por bloco. Como eram três os microrganismos testados, pelo menos 24 unidades amostrais foram preparadas para ser utilizadas em cada repetição.

#### **c) Teste da exclusão da presença de *Klebsiella pneumoniae*, *Cronobacter sakazakii* e *Escherichia coli* nas amostras de alface utilizadas no teste de inativação**

Três amostras da alface, preparadas para receberem o inóculo, foram escolhidas aleatoriamente, para o teste de exclusão. Foram adicionados 90 mL de água petonada esterilizada a cada amostra. As amostras foram homogeneizadas e realizadas diluições decimais do homogenato. Alíquotas de 1 mL das diluições escolhidas foram plaqueadas em profundidade em ágar MacConkey, para confirmação da ausência de *Klebsiella pneumoniae* e *Cronobacter sakazakii* e, em placas petrifilm™ para confirmar a ausência de *E. coli*. As placas de ágar MacConkey foram incubadas a 37 °C, mas, as Petrifilm™ à 35 °C, ambas, por 24 h.

#### **d) Contaminação intencional das folhas de alface**

Cada folha de alface foi assepticamente acondicionada em um exclusivo saco de polietileno esterilizado a 121 °C, por 15 min. Cada folha recebeu, com o auxílio de uma micropipeta, 0,1 mL da cultura do microrganismo testado, na ordem de 6 log UFC·mL<sup>-1</sup>. As folhas intencionalmente contaminadas com as células foram armazenadas sob temperatura de 10 °C, por 12 h, para adesão das bactérias.

#### **e) Preparo das soluções sanitizantes à base de cloramina orgânica e de vinagre acrescentada ou não de cloreto de sódio**

As soluções sanitizantes utilizadas nesse teste foram preparadas a partir da cloramina orgânica (Nippo-clor), vinagre escuro comercial (Toscano) e cloreto de sódio (Aldrich®). Os testes de inativação foram realizados com: a) água destilada esterilizada; b) cloramina orgânica na concentração de 170 mg·L<sup>-1</sup> de CRT, pH 6,0 a 22 °C; c) solução de ácido acético 1,5%, (v/v), pH 2,60 a 22 °C; d) solução de ácido acético 1,5% (v/v) + cloreto de sódio 0,5% (p/v), pH 2,65 a 22 °C.

Para o tratamento com água e cloramina orgânica, foram transferidos para erlemeyers 2 L de água destilada. Para as soluções de ácido acético, pesaram-se 10 g de cloreto de sódio em um erlemeyer seco e foram adicionados 1.250 mL de água destilada. Em outro, transferiram-se somente 1.250 mL de água destilada, sendo os materiais autoclavados a 121 °C, por 15 min. Após resfriadas, as soluções foram preparadas. Pesaram-se 10 g de cloramina orgânica e transferidas para 2 L de água destilada. Mediram-se volumetricamente 750 mL de vinagre, que foram transferidos para os erlenmeyers, contendo 1.250 mL de água destilada. As soluções foram agitadas manualmente para homogeneização das soluções.

Prepararam-se as soluções de neutralização a partir do tiosulfato de sódio e de uma solução de NaOH.

O cloro residual na solução de inativação foi determinado pelo método iodométrico (GREENBERG; CLESCERI; EATON, 1992), sendo as concentrações do ácido acético determinadas pelo método da acidez total titulável (AOAC,1994).

O pH das soluções de vinagre e da cloramina orgânica, assim como a neutralização dos princípios ativos foram determinados pelo método potenciométrico, utilizando-se o potenciômetro digital (DM 20, da marca Digimed), previamente calibrado.

Todos os procedimentos foram realizados sob técnicas assépticas.

#### **f) Ação dos sanitizantes sobre os microrganismos aderidos**

A folha de alface com o microrganismo aderido foi rinsada por 1 min com 200 mL de água destilada esterilizada para remoção das células planctônicas ou aderidas

fracamente, e a água, descartada. Em seguida, a solução sanitizante testada ou água destilada esterilizada foi transferida, em excesso, para o saco plástico contendo a amostra. O tempo de contato foi de 20 min para todos os ensaios realizados. Ao fim do tempo de contato, a solução de inativação foi adicionada ao tratamento. A amostra foi retirada e transferida para outro saco plástico. Adicionaram-se 90 mL de água peptonada 0,1%. A amostra foi introduzida no homogeneizador de amostras (Marconi, modelo MA 440/CF) e homogeneizada por 2 min à velocidade máxima.

Para analisar se havia diferença entre o uso de meio seletivo e não seletivo na recuperação de células injuriadas, duplicatas de 1 mL das diluições escolhidas foram inoculadas pelo método da profundidade em placas de Petri esterilizadas. O ágar MacConkey e o ágar-padrão para contagem foram utilizados para o cultivo a 35 °C, por 24 h. Colônias de morfologias características dos microrganismos testados que cresceram no ágar MacConkey foram enumeradas e as contagens comparadas com as do ágar padrão. Não houve diferença e, portanto, o ágar MacConkey foi utilizado para enumeração.

Realizaram-se diluições decimais seriadas do homogenato e alíquotas de 1 mL das diluições escolhidas, plaqueadas pelo método da profundidade. As placas foram incubadas e as colônias enumeradas, sendo os resultados expressos em log UFC.g<sup>-1</sup>.

As colônias típicas dos microrganismos que cresceram em ágar MacConkey foram selecionadas e os microrganismos confirmados pelo sistema API 20E, metodologia descrita por Kornacki e Johnson (2001).

#### **g) Análise dos resultados**

O logaritmo decimal da população de microrganismos sobreviventes após os tratamentos obtidos pelas contagens das placas foi organizado em planilhas eletrônicas do Microsoft Excel<sup>®</sup>. As reduções decimais foram determinadas pelo seguinte cálculo:

$$RD = \log N_0 - \log N_f \quad (\text{Eq. 50})$$

Em que:

$N_0$  = número de células antes do tratamento;

$N_f$  = número de células sobreviventes ao tratamento.

A atividade bactericida das soluções sanitizantes foi avaliada pelos números de ciclos logarítmicos reduzidos na população. Para serem considerados eficazes, os agentes sanitizantes químicos devem inativar a população de células planctônicas em,



pelo menos, cinco ciclos logarítmicos (99,999%), após trinta segundos de contato à temperatura de 20 °C. Para a população de células sésseis, essa redução deve ser de, pelo menos, três ciclos logarítmicos (99,9%) nas mesmas condições de tempo e temperatura (MOSTELLER; BISHOP, 1993).

#### **h) Delineamento experimental**

Os experimentos foram realizados em blocos casualizados com três repetições. A eficiência dos sanitizantes foi comparada pela análise de variância (ANOVA) para determinar se houve diferença estatisticamente significativa entre elas ( $P < 0,05$ ). Quando a ANOVA apresentou diferença estatística entre os tratamentos, o teste Tukey foi utilizado para mostrar qual tratamento foi significativo. A ANOVA foi realizada após execução do teste de Bartlett.

Os dados foram analisados com o auxílio do pacote estatístico Statgraphics Centurion XV, versão 15.

### **3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos da inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida à folha de alface Vitória de Santo Antão**

Em experimentos preliminares, observou-se que tratamentos com tempos de contato mais longos, por exemplo, de 15 min, 20 min, 25 min e 30 min de duração, não apresentavam reduções decimais maiores na população de *K. pneumoniae* aderida à alface. Portanto, resolveu-se esclarecer a cinética de inativação de *K. pneumoniae* aderida à folha de alface pelos mesmos tratamentos realizados nos restaurantes.

#### **a) Definição do microrganismo-alvo**

Durante realização da análise de perigos, *K. pneumoniae* foi a enterobactéria prevalente na alface pronta para consumo. Por esse motivo foi escolhida para estudos de inativação com os produtos utilizados nos restaurantes.

#### **b) Preparo da suspensão de enterobactérias**

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.6.1 a. Para ser inoculada na alface, a suspensão de células de *K. pneumoniae* foi diluída, para que o número atingisse  $6 \log \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### **c) Preparo das folhas de alface e contaminação intencional**

As folhas de alface foram preparadas como descrito no item 3.6.2 b. Cada folha de alface foi acondicionada, assepticamente, em um exclusivo saco de polietileno

esterilizado a 121 °C, por 15 min. Cada folha recebeu com o auxílio de uma pipeta 1 mL da cultura do microrganismo testado, na ordem de 6 log UFC·mL<sup>-1</sup>.

As folhas intencionalmente contaminadas com as células foram armazenadas a 10 °C, por 12 h, para adesão das bactérias.

#### **d) Determinação da população inicial na superfície da alface**

Seis amostras foram escolhidas aleatoriamente dentre as alfaces preparadas para cada um dos experimentos para determinação da população inicial média de *K. pneumoniae* aderida às folhas de alface submetidas aos tratamentos. Cada amostra foi rinsada, por 1 min, com 200 mL de água destilada esterilizada, usada para remoção de células planctônicas ou fracamente aderidas, e a água, descartada. Foram adicionados 90 mL de água peptonada 0,1% (p/v), sendo a amostra homogeneizada por 2 min, à alta velocidade. O homogenato foi decimamente diluído e as duplicatas de 1 mL das diluições escolhidas inoculadas pelo método da profundidade em placas de Petri esterilizadas. As células foram cultivadas em ágar MacConkey sendo incubadas a 35 °C, por 24 h. As colônias foram enumeradas e a população inicial média determinada para cada um dos experimentos realizados.

#### **e) Preparo das soluções sanitizantes**

Foram preparadas soluções nas concentrações aproximadas das utilizadas nos restaurantes comerciais de Viçosa, MG. Uma solução foi preparada a partir do produto comercial Nippo-clor contendo 170 mg·L<sup>-1</sup> de cloro, expressos em CRT e pH 6,2. A solução de ácido acético foi usada na concentração de 0,18% (v/v) e pH 2,78, preparada a partir do vinagre escuro, da marca Toscano.

#### **f) Determinação da cinética de inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida à folha de alface Vitória de Santo Antão**

Os experimentos foram realizados em duas etapas. Na primeira, experimento 1, foram planejados oito tempos de tratamentos, com intervalos de 8 min entre eles, sendo 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 e 64 min. Na segunda etapa, experimento 2, foram planejados oito tempos de tratamentos, sendo 30 s, 1, 2, 3, 4, 5, e 8 min.

O número de amostras preparadas para os experimentos foi determinado pelos tempos planejados. Prepararam-se pelo menos 20 amostras para cada repetição do experimento 1, e 22 amostras as repetições do experimento 2.

As análises foram realizadas em duplicatas, com duas repetições.

### g) Realização do tratamento

Após o tempo de adesão, a unidade amostral ensaiada foi rinsada por 1 min, com 200 mL de água destilada esterilizada, para remoção de células planctônicas ou fracamente aderida, e a água, descartada. A solução sanitizante testada foi transferida, em excesso, para o saco plástico cobrindo-se a alface. No tempo de contato determinado, a solução de inativação foi adicionada para interromper a ação do sanitizante. A solução de tiosulfato de sódio 0,5% (p/v) foi o neutralizante, para as soluções cloradas. A solução de ácido acético foi neutralizada por diluição em água peptonada.

### h) Determinação do número de sobreviventes

A folha de alface foi transferida para outro plástico esterilizado e foram adicionados 90 mL de água peptonada 0,1% (p/v) à amostra. A amostra foi homogeneizada por 2 min em velocidade máxima. Do homogenato, retirou-se assepticamente 1 mL e diluições decimais foram preparadas. O método de plaqueamento em profundidade foi utilizado para enumeração da *K. pneumoniae* em ágar MacConkey (Acumedia®) e as placas incubadas a 35 °C ± 2 °C, por 24 h. As colônias foram enumeradas e a média da população de sobreviventes determinada a cada tempo ensaiado.

### i) Ajuste do modelo cinético

O modelo cinético, que descreve curvas de sobreviventes considerando-se a variabilidade de resistência dentro da população, Equação 51, proposto por Pruitt e Kamau (1993), foi usado para descrever a curva de sobreviventes.

$$\ln(S) = \ln \left[ f e^{-b_1 t} + (1 - f) e^{-b_2 t} \right] \quad (\text{Eq. 51})$$

Em que:

S é a fração total de sobreviventes ( $x/x_0$ ) no tempo t;

f é a fração de sobreviventes da subpopulação 1, mais sensíveis;

(1 - f) é a fração de sobreviventes da subpopulação 2, menos sensíveis;

b<sub>1</sub> é a taxa de morte específica da subpopulação 1; e

b<sub>2</sub> é a taxa de morte específica da subpopulação 2;

As estimativas dos parâmetros cinéticos f e de b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub> foram obtidas por regressão não linear, utilizando-se o *software* Statistica® versão 7.

Os tempos de reduções decimais ou valores D foram obtidos usando-se a seguinte equação:

$$D_i = \frac{2,303}{b_i} \quad (\text{Eq. 52})$$

Em que:

*i* é a fração 1 ou 2 da população de *K. pneumoniae*.

### **3.8. Tempo de adaptação e crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em alface Vitória de Santo Antão**

O tempo de adaptação e o crescimento de *K. pneumoniae* na alface da variedade Vitória de Santo Antão foram avaliados como resposta ao efeito de diferentes temperaturas. Foi observada a maior incidência de *K. pneumoniae* na alface pronta para consumo, o que sugeriu para esta pesquisa que a contaminação ocorreu pós-processamento. Por isso, foi estudado o crescimento da bactéria em folhas de alface lavada e sanitizada.

#### **3.8.1. Microrganismo**

Foi utilizada a bactéria isolada da alface e identificada pelo sistema API 20E como *K. pneumoniae* mantida criopreservadas a -85 °C em caldo BHI (Merck®) e glicerol na proporção de 20% (v/v) no LHMA do DTA/UFV. As células foram usadas após serem ativadas por três transferências em caldo tripticase de soja (Difco®) e incubadas à temperatura de 35 °C ± 2 °C em condições estáticas. As culturas de células foram centrifugadas a 12.000 g por 2 min. O concentrado de células formado foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada. Prepararam-se o inóculo ressuspensando as células em 10 mL de água destilada esterilizada. Foi retirada assepticamente uma alíquota de 1 mL da suspensão do inóculo e preparadas diluições decimais para obtenção de um inóculo contendo 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> células por mL. Alíquotas desta diluição foram inoculadas em ágar MacConkey incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período, enumeraram-se as colônias, sendo o número de UFC·mL<sup>-1</sup> do inóculo quantificado. A concentração de células na suspensão foi de 8,0 log UFC·mL<sup>-1</sup>.

#### **3.8.2. Preparo das folhas de alface e contaminação intencional**

A alface foi adquirida em mercado local da cidade de Viçosa, MG e enviada LHMA do DTA/UFV em caixa de isopor com gelo reciclável. Folhas externas e centrais foram

removidas e descartadas. Utilizaram-se folhas internas íntegras que tiveram peso ajustado para 10 g. As folhas foram lavadas sob água corrente e sanitizadas com solução clorada na concentração de 200 mg·L<sup>-1</sup> de CRL, pH 6,2, a partir de dicloroisocianurato de sódio com tempo de contato de 15 min. O cloro foi inativado com solução de tiosulfato de sódio 0,5% (p/v), por 1 min. As folhas foram enxaguadas duas vezes com água esterilizada e transferidas para sacos plásticos esterilizados perfurados. A alface foi drenada, por uma hora, a 4 °C. As folhas foram cortadas assepticamente em pedaços de 3 cm x 3 cm, aproximadamente, e usando-se pinças, tábua de altileno e faca esterilizadas.

Para facilitar a inoculação, 100 g de alface foram transferidos para sacos plásticos esterilizados maiores, medindo 40 x 25 cm. Com o auxílio de uma pipeta, a alface recebeu o inóculo de 1 mL da suspensão bacteriana diluída em água peptonada 0,1% (p/v) contendo entre 3 e 4 log UFC, em diferentes pontos do pacote. O saco foi fechado e agitado, gentilmente, com as mãos em várias direções por 30 vezes, para assegurar a distribuição das células microbianas sobre a alface. Assepticamente, o saco foi aberto e as folhas inoculadas mantidas a 25 °C, por 1 h. As condições assépticas do ar foram propiciadas por chama de dois bicos de Bunsen.

### **3.8.3. Planejamento experimental**

O crescimento na alface foi monitorado em cinco temperaturas diferentes: 5 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C e 40 °C. As análises foram realizadas em duplicatas e usando-se duas placas para cada duplicata em cada intervalo de tempo. Os experimentos foram feitos com três repetições.

Os intervalos de tempo planejados para amostragem basearam-se nos dados de crescimento de enterobactérias em caldo fornecidos pelo *Pathogen Modelling Program* – PMP, versão 7.0 (fornecido por *US Department of Agriculture – Agricultural Research Service* USDA-ARS) e resultaram em 12 a 18 pontos amostrados em cada temperatura estudada.

Essa metodologia teve como fundamentos os experimentos realizados por Koseki; Isobe (2005a).

Cada unidade amostral foi constituída de 10 g de alface inoculada com a bactéria testada. Cada amostra de 10 g de alface inoculada com *K. pneumoniae* foi pesada, assepticamente, em sacos de polietileno esterilizados exclusivos, medindo 30 x 20 cm. Foram preparadas duas amostras para cada intervalo amostrado e identificados com os horários de realização da análise. Para determinação do número inicial de células, três amostras foram analisadas antes da incubação e estocadas nas temperaturas testadas

sob condições constantes. O crescimento foi monitorado por plaqueamento em profundidade em ágar MacConkey, até alcançar a fase estacionária, que é evidenciada pela estabilização da contagem em placas.

#### 3.8.4. Amostragem

De acordo com a temperatura, estabeleceram-se os tempos de amostragem para a construção das curvas de crescimento. Intervalos mais curtos de tempos de amostragem foram determinados inicialmente, a fim de estabelecer a duração da fase lag do microrganismo na alface.

No tempo estabelecido, duas amostras foram retiradas da estufa e rinsadas com 200 mL de água destilada esterilizada por 1 min, para remoção das células planctônicas. A água foi drenada e descartada. Foram adicionados à alface 90 mL de água peptonada 0,1% (p/v) e homogeneizado por 2 min em velocidade máxima. Do homogenato, diluições decimais apropriadas foram inoculadas em profundidade no ágar MacConkey em duplicatas, sendo as placas incubadas invertidas a  $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , por 24 h.

Placas com até 250 colônias foram selecionadas para enumeração realizada com auxílio de um contador de colônia. Selecionaram-se duas colônias de cada placa para serem confirmadas pelo sistema API 20E (Biomérieux®).

O tempo (h) amostrado e as médias das contagens foram organizados em planilhas eletrônicas do Excel, e o número das contagens foi transformado em  $\log_{10}$ .

#### 3.8.5. Análise dos dados de crescimento

##### a) Modelos primários

Os dados de crescimento obtidos experimentalmente foram ajustados com as equações utilizando-se a macro, que é uma rotina programada dentro da planilha eletrônica Microsoft Excel®, denominada DMFit (fornecida por J. Baranyi, *Institute of Food Research, Norwich, UK*) executada a partir da planilha eletrônica Microsoft Excel®.

Foram estimados os parâmetros cinéticos de crescimento da bactéria como o tempo de adaptação fase lag ( $\lambda$ ), a velocidade máxima de crescimento ( $\mu$ ), e a densidade populacional máxima (DPM), usando-se os modelos primários:

##### i) Modelo de Gompertz

$$y(t) = a + c * \exp\{-\exp[-b(t - M)]\} \quad (\text{Eq. 53})$$

Em que:

$y(t)$  é o  $\log_{10}$  da população bacteriana ( $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  no tempo t);

a é o  $\log_{10}$  do número inicial de microrganismos ( $N_0$ );  
 c é o  $\log_{10}$  ( $N - N_0$ ) no final da fase lag;  
 b é a inclinação correspondente à taxa de crescimento;  
 M é tempo na qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima; e  
 t é o tempo.

ii) Modelo de Baranyi e Roberts

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln\left(1 + \frac{e^{m\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}}\right) \quad (\text{Eq. 54})$$

Em que:

$y_0$  é a concentração de células no  $t_0$ ;

$y_{\max}$  é a concentração máxima de células;

$\mu_{\max}$  é a taxa específica de crescimento máximo ( $\text{h}^{-1}$ ); e

m é o parâmetro relacionado à curvatura depois da fase exponencial.

A função  $A(t)$  provoca a diminuição gradual da velocidade de crescimento ao longo do tempo. É assim expressa:

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})}{v} \quad (\text{Eq. 55})$$

O parâmetro  $h_0 = -\ln\alpha_0$ . E  $\alpha_0$  é chamado de estado fisiológico da célula no  $t=t_0$ , e deve ser, pelo menos, de maneira aproximada, a mesma para os experimentos em que a história da pré-inoculação das células é idêntica.

**b) Modelos secundários**

A duração da fase lag, parâmetro  $\lambda$ , foi avaliada pelos modelos de Arrhenius e Weibull.

A velocidade específica do crescimento máximo, parâmetro  $\mu_{\max}$ , foi avaliada pelos modelos secundários de Raiz Quadrada, de Ratkowsky modificado, Arrhenius e Weibull.

i) Modelo de Raiz Quadrada

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (\text{Eq. 56})$$

Em que:

k é a taxa de crescimento;

T é a temperatura;

$T_{\min}$  é a temperatura abaixo da qual não há crescimento; e

b é o parâmetro a ser estimado.

ii) Modelo de Ratkowsky modificado:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \{1 - \exp[c(T - T_{\max})]\} \quad (\text{Eq. 57})$$

Em que:

b, T e  $T_{\min}$  têm o mesmo significado como na equação anterior;

$T_{\max}$  é a temperatura limite superior, em que nela e além dela a taxa de crescimento predita é zero; e

c é um parâmetro adicional para capacitar o modelo a ajustar-se aos dados quando as temperaturas estão próximas ou acima da ótima para o crescimento.

iii) Modelo Arrhenius

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{-Ea}{R.T}} \quad (\text{Eq. 58})$$

Em que:

k é o parâmetro do modelo ( $\mu$ ,  $\lambda$  ou A) numa determinada temperatura;

$k_0$  é um fator pré-exponencial;

Ea é a energia de ativação;

R é a constante universal dos gases; e

T é a temperatura, em graus Kelvin.

iv) Modelo de Weibull

$$k = b.T^n \quad (\text{Eq. 59})$$



Em que:

k é o parâmetro do modelo ( $\lambda$ );

b é o parâmetro de escala; e

n é o parâmetro de forma, ambos obtidos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais. Quando  $n < 1$ , a concavidade da curva é para cima. Quando  $n > 1$ , esta concavidade é para baixo e, se  $n = 1$ , é linear.

### c) Validação dos modelos

A validação dos modelos foi realizada por meio de procedimentos estatísticos. Utilizaram-se os índices de validação, o fator bias e o fator exatidão para quantificar a confiança nas predições do modelo. Utilizou-se, também, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e a raiz quadrada do quadrado médio do resíduo.

#### i) Fator bias

A Equação 60 representa o cálculo do fator bias.

$$fb = 10^{(\sum \log(P/O)/n)} \quad (\text{Eq. 60})$$

Em que:

n é o número de dados;

P é o valor predito; e

O é o valor experimental observado. Quando o valor desse fator é maior que 1 indica que o modelo superestima as observações, sendo as predições falhas pelo lado perigoso “*fail dangerous*”. Já quando esse valor é menor que 1 indica que as predições do modelo falham pelo lado seguro “*fail-safe*”.

#### ii) Fator exatidão

A Equação 61 apresenta o cálculo do fator exatidão.

$$fe = 10^{\left( \frac{\sum \left| \log \left( \frac{\text{predito}}{\text{observado}} \right) \right|}{n} \right)} \quad (\text{Eq. 61})$$

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

iii) Coeficiente de correlação

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) é também utilizado como uma medida total da predição alcançada. Foi empregado para medir a fração de variação sobre a média que é explicada pelo modelo. Valores de  $R^2$  próximos de 1 ( $0 < R^2 < 1$ ) significam melhor predição realizada pelo modelo (GRAU; VANDERLINE, 1993).

iv) Raiz quadrada do quadrado médio do resíduo (RMSE)

A raiz quadrada do quadrado médio do resíduo é a raiz quadrada da soma quadrática do resíduo dividido pelos graus de liberdade, que é expresso pela Equação 62.

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSE}{n}} = \sqrt{\frac{\sum (\mu_{observado} - \mu_{predito})^2}{n}} \quad (\text{Eq. 62})$$

Quanto menor o RMSE, melhor é a adequação para descrever os dados (RATKOWSKY, 2003).

### **3.9. Avaliação quantitativa do provável consumo da bactéria *K. pneumoniae* veiculada pela alface preparada nos restaurantes comerciais de Viçosa, MG**

Foram realizadas avaliações qualitativas e quantitativas do provável consumo da bactéria *K. pneumoniae* veiculada pela alface preparada nos restaurantes comerciais. A partir do logaritmo das contagens de *K. pneumoniae* observadas nas amostras coletadas dos restaurantes foram estimados os valores expressos em  $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  preditos na temperatura e nos tempos de exposição observados nos restaurantes.

A frequência e a quantidade de alface consumida nos restaurantes foram combinadas para estimar a exposição da população usuária dos restaurantes ao perigo.

Procurou-se responder às seguintes questões:

- i) Qual a possibilidade de o alimento contaminado ser consumido?
- ii) Qual é o número estimado do patógeno presente no alimento no momento da ingestão?

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização da superfície foliar por microscopia eletrônica de varredura

#### 4.1.1. Superfície e ceras

Nas fotomicrografias, observou-se que a superfície foliar da alface Vitória de Santo Antão apresentou características marcantes em sua micromorfologia (Figura 8). A superfície abaxial é constituída de células epiteliais irregulares, rugosas, com estômatos, porém, em menor quantidade que a superfície adaxial. O número de tricomas apresentou-se em quantidade muito menor na região abaxial. Estimou-se, para a superfície abaxial, a presença de um estômato para cada nove células epiteliais. Os estômatos concentraram-se em pequenas depressões, e a maioria não apresentou qualquer cobertura de cera. Sabe-se que a quantidade de estômatos presentes na superfície foliar pode ser influenciada pelas condições ambientais de crescimento das plantas como irrigação e insolação.

Pode haver uma relação entre quantidade de estômatos e quantidade de células de patógenos aderidas. Teoricamente, folhas de alface com um número maior de estômatos por unidade de área superficial podem aumentar as chances de entrada de células de *E. coli* O157:H7 (TAKEUCHI; FRANK, 2001).

A presença de ceras epicuticulares foi observada em ambas as faces da folha. A cera apresentou-se amorfa, como pequenos grânulos espalhados pela superfície ou depositados em depressões. Em alguns casos, as ceras cobriam completamente a abertura dos estômatos (Figura 8-B).

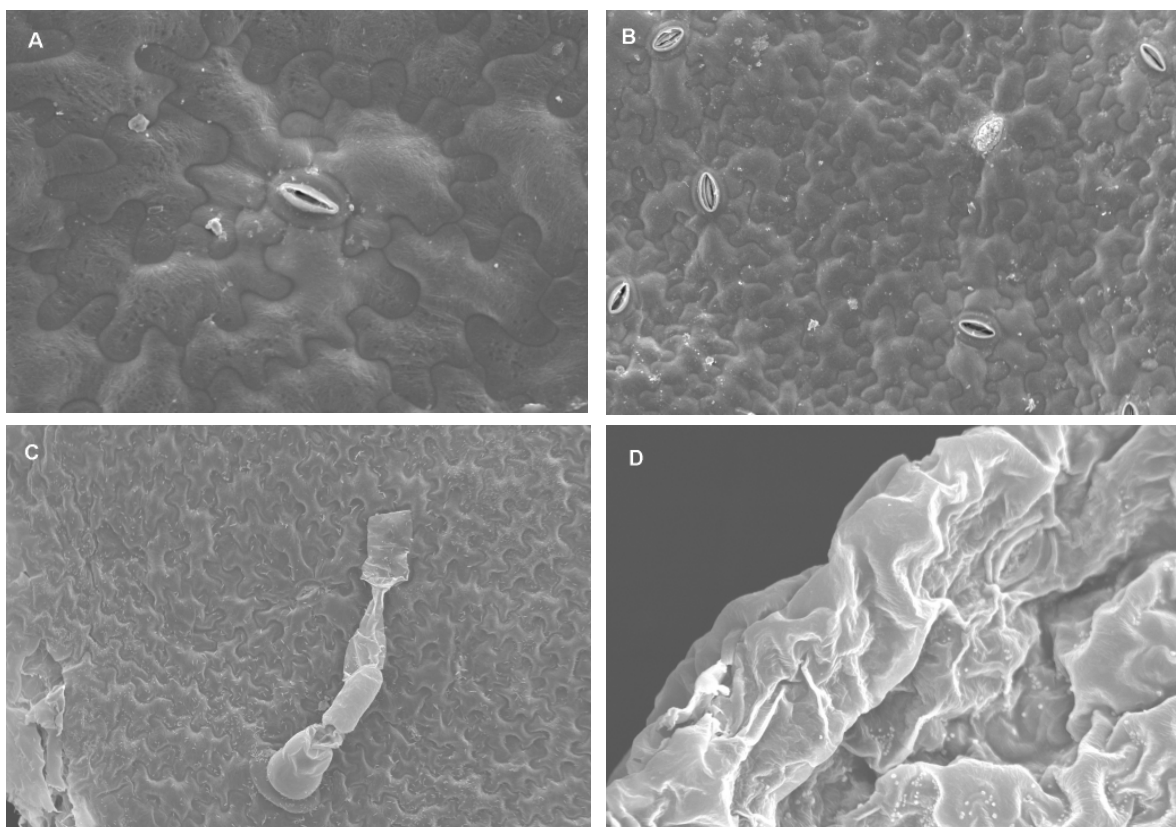


Figura 8 - Fotomicrografias da superfície foliar da alface Vitória de Santo Antônio. A) Vista geral da superfície abaxial com células epiteliais, um estômato e ceras epicuticulares; B) Detalhe de um estômato recoberto de ceras; C) Detalhe da rugosidade da superfície e um tricoma; D) Detalhe da borda intacta natural da beirada da folha de alface. A e B são superfícies sanitizadas e C e D são superfícies somente lavadas.

Na maioria das espécies vegetais, a quantidade de ceras epicuticulares varia de 10 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , embora volumes acima de 300  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  foram informados (BAKER, 1982; MCWHORTER; OUZTS, 1993). A composição química das ceras epicuticulares é variável dentre os distintos grupos filogenéticos, com diferenças também dentro dos mesmos grupos e espécies ou em diferentes estádios de crescimento de um mesmo indivíduo. Os principais componentes químicos das ceras epicuticulares são n-alcanos, ésteres, alcoóis e ácidos graxos. A cera será mais hidrofóbica quanto mais apolar for seu constituinte químico (CHACHALIS; REDDY; ELMORE, 2001).

A composição química dessas ceras está relacionada com a morfologia de sua cristalização. Por exemplo, os hidrocarbonos e os alcoóis primários cristalizam-se na forma de placas. Os alcoóis secundários e as cetonas cristalizam na forma de túbulos, e os aldeídos na forma de grânulos. Quando as ceras são compostas por triterpenoides e acil ésteres, não há formação de cristais, sendo as suas estruturas, na sua maioria, amorfas (CHACHALIS, REDDY; ELMORE, 2001).

#### 4.1.2. Adesão de *Escherichia coli* O157:H7 à superfície foliar da alface

A adesão de *E. coli* O157:H7 determinada pela contagem em placa indicou que o número de células aderidas nas bordas cortadas foi consideravelmente mais alto que o número de células aderidas na superfície central do cupom de alface (Tabela 2). No cupom, íntegro e com adesão, o número total de células aderidas foi estimado em 5,96 log UFC·cm<sup>-2</sup> de superfície. Porém, o número de células, somente nas bordas de 1 mm, foi 5,60 log UFC. Observou-se que a concentração de células foi maior do que o número de células aderidas à região central, estimadas em 4,21 log UFC.

Tabela 2 - Variação das contagens, médias ( $\bar{x}$ ) e desvios-padrão das médias (s) dos logaritmos de células de *Escherichia coli* O157:H7 inoculadas e aderidas nas superfícies e nas beiradas cortadas nos cupons de alface Vitória de Santo Antão

<b>Contaminação artificial com <i>E. coli</i> O157: H7</b>	<b>Faixa de contagem</b>	<b>Adesão (log UFC)</b> $\bar{x} \pm s$
Total da adesão ao cupom (log UFC·cm <sup>-2</sup> )	5,98 - 5,93	5,96 ± (0,02)
Adesão às beiradas cortadas (log UFC)	5,50 - 5,69	5,60 ± (0,09)
Adesão à parte central (log UFC)	3,84 - 4,50	4,21 ± (0,34)

Este número de células aderidas não caracteriza um biofilme bem estabelecido, mas, um processo de adesão. É o resultado entre as forças atrativas e repulsivas que regulam a interação entre a superfície foliar e o microrganismo. Por exemplo, a menor concentração de células observadas na superfície intacta pode ser associada com propriedades da superfície, como rugosidade e hidrofobicidade.

Nas fotomicrografias observou-se que as células de *E. coli* O157:H7 estavam aderidas às regiões abaxial e adaxial. Na literatura, há informações de que as bactérias encontram-se, naturalmente, em maior quantidade na parte inferior que na parte superior da folha. Isto ocorre em razão do maior número de estômatos e de tricomas, uma camada cuticular mais fina e, também, por causa da menor exposição à radiação ultravioleta nessa superfície (SOLOMON; BRANDL; MANDRELL, 2006).

Observou-se, também, que estômatos e tecidos danificados (Figura 9-A) serviram de entrada e abrigo para células do patógeno. Foram visualizados, tanto na alface inoculada quanto na naturalmente contaminada, vários estômatos colonizados por mais de uma bactéria (Figura 9-B). De acordo com Beattie e Lindow (1995), as bactérias penetram em estômatos e alojam-se em câmaras subestomáticas. A partir daí podem acessar o espaço intercelular abaixo do estômato. Para sobreviverem, alojam-se em estruturas com espaços interconectados e têm que adaptar-se a um vasto habitat que

tem alto potencial de oferecer condições para o crescimento, como água e nutrientes (SOLOMON; BRANDL; MANDRELL, 2006).

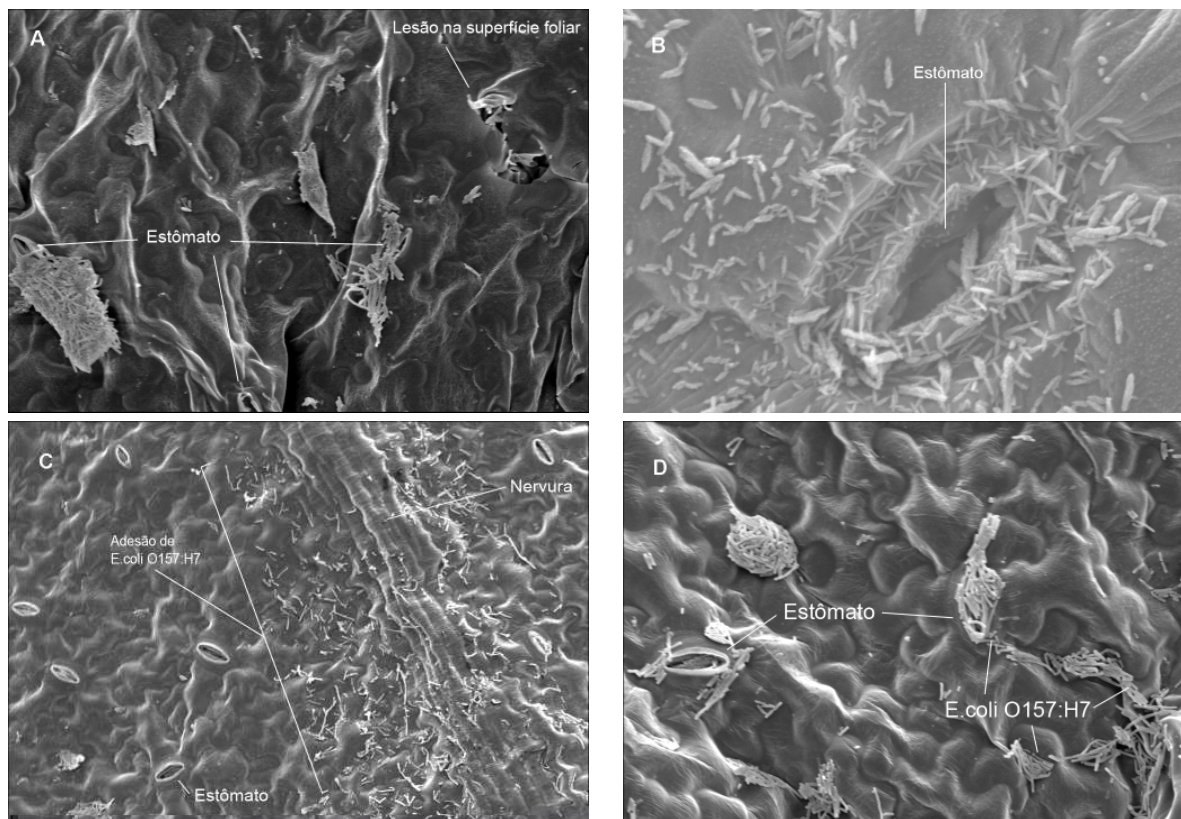


Figura 9 - Fotomicrografias dos sítios de adesão de *Escherichia coli* O157:H7 e da microbiota natural na superfície foliar da alface Vitória de Santo Antão. A) Células de *Escherichia coli* O157:H7 colonizadas em estômatos e em lesões; B) Microbiota natural da alface colonizada no estômato; C) Adesão de células de *Escherichia coli* O157:H7 ao longo da nervura; e D) Aglomerados de células de *E. coli* O157:H7, colonização de estômatos e adesão em dobraduras na superfície irregular.

Nesta pesquisa, sítios de adesão da bactéria *E. coli* O157:H7 na folha de alface incluíram cutículas, dobras naturais das cutículas, estômatos, tecidos danificados e nervuras (Figura 9-C). A explicação pode ser associada à abundância de nutrientes exsudados de fendas da camada cuticular. Bactérias são observadas em depressões, abaixo da cutícula e em estruturas específicas de uma planta em particular.

Outro fato observado é a adesão formando aglomerados de células (Figura 9-D). Há evidências de que a bactéria é circundada por uma camada de polissacarídeos extracelulares na superfície das folhas. Nas fotomicrografias eletrônicas de varredura, notou-se que exopolissacarídeos podem ancorar as células na superfície das folhas, o que previne o dessecamento e modifica o ambiente circundante para torná-lo mais favorável ao crescimento e à sobrevivência. A partir dessa matriz podem ser originados

os biofilmes, que podem concentrar nutrientes de fontes diluídas, fornecerem proteção de predadores e proteger as células de enzimas líticas e outros compostos inibitórios. A produção dessa matriz sobre as folhas pode ser altamente vantajosa para sobrevivência e crescimento (SOLOMON; BRANDL; MANDRELL, 2006).

Os fragmentos de 1 mm retirados das bordas dos cupons de 1cm x 1cm, foram observados pela MEV (Figura 10) e apresentaram altas concentrações de células aderidas com formação de aglomerados celulares que cobriram completamente as estruturas internas da folha (Figura 10-B). Assim, nesse experimento, *E. coli* O157:H7 aderiu preferencialmente nas bordas cortadas da alface Vitória de Santo Antão (Figura 10-C). Resultados semelhantes foram observados por Seo; Frank (1999), Takeuchi et al. (2000) e Takeuchi; Frank (2001), que constataram que *E. coli* O157:H7 aderiu preferencialmente na extremidade cortada da folha de alface.

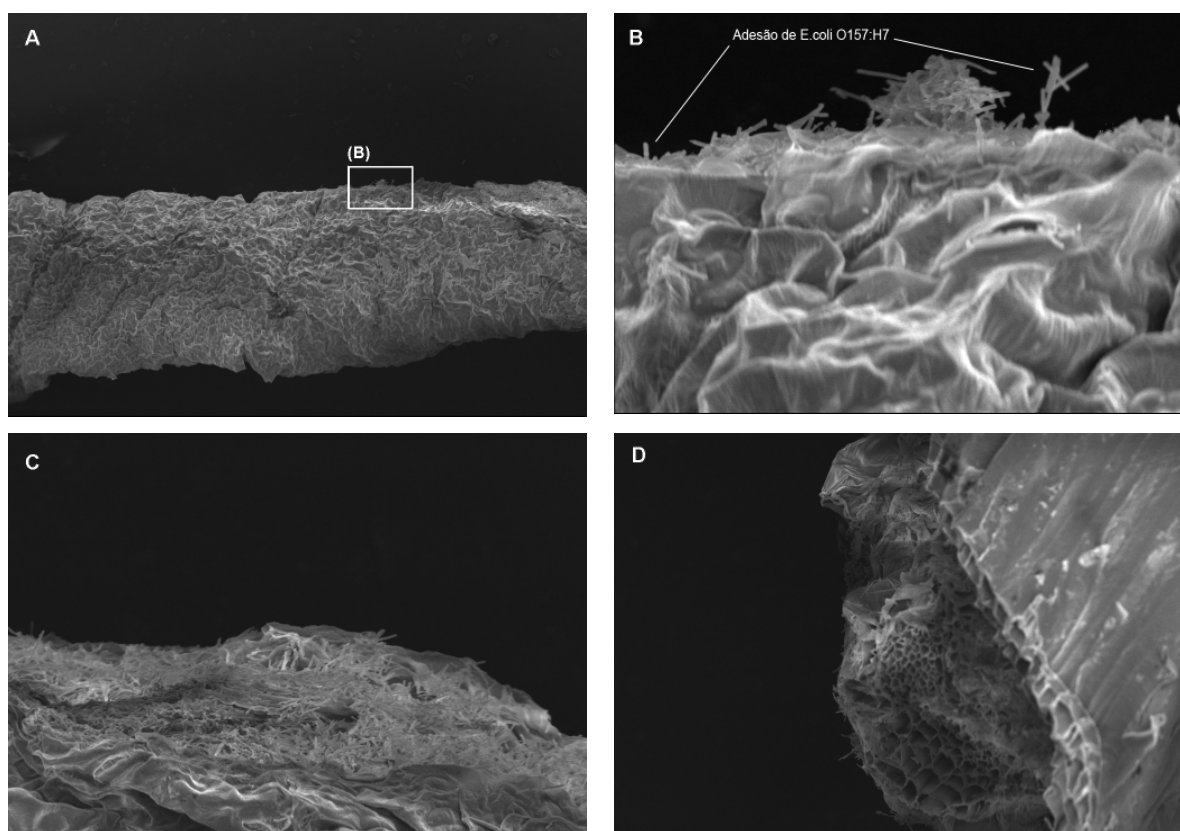


Figura 10 - Fotomicrografias das bordas dos cortes de 1 mm de cupons das superfícies foliares de alface Vitória de Santo Antão aderidas com *Escherichia coli* O157:H7. A) Visão global; B) Visão lateral com células de *Escherichia coli* O157:H7 aderidas à superfície; C) Cobertura de células por toda extensão da borda cortada; e D) Borda cortada sem adesão.

A adesão a essas estruturas pode envolver interações eletrostáticas, hidrofóbicas e hidrofílicas. A hidrofobicidade da superfície celular é um fator importante para adesão

bacteriana. Além disso, as cargas da superfície podem desempenhar importante papel na interação com superfícies sólidas. As cargas são influenciadas por grupamentos carboxílicos, amino, fosfato e sulfato do envelope celular e pela presença de fímbrias e flagelos (SHARMA; CHANG; YEN, 1985; LI; MCLANDBOROUGH, 1999).

Hassan e Frank (2004) estudaram, além da produção de cápsula, a hidrofobicidade da superfície celular e cargas de células de *E. coli* O157:H7 cultivadas em caldo tripticase de soja (TSB) e caldo nutriente. Constataram que células cultivadas em TSB eram mais hidrofílicas que as cultivadas em caldo nutriente. Os autores constataram que as células cultivadas em meios diferentes apresentaram valores similares de potencial eletrocinético. Os resultados permitiram aos autores concluir que as interações eletrostáticas não são responsáveis pelas diferenças na capacidade de adesão das células cultivadas nos diferentes meios. Portanto, a carga bacteriana foi atribuída aos constituintes da parede celular, incluindo grupamentos fosfatos, grupos carboxílicos e proteínas. A composição do meio de crescimento influenciou a hidrofobicidade e não a carga de superfície, o que indicou a falta de associação entre essas duas propriedades de superfície.

Nesse estudo, as células foram cultivadas em caldo nutriente e, portanto, seriam menos hidrofílicas. Porém, foi observado que as células estavam aderidas em maior concentração na superfície hidrofílica das bordas cortadas.

Há evidências de que bactérias produzem lectinas que podem mediar suas interações com carboidratos presentes nas superfícies das plantas. Sudakeviitz et al. (2004) caracterizaram duas lectinas em *Ralstonia solanacearum* que possuíam alta afinidade por açúcares presentes nas plantas. Uma dessas lectinas, denominada RS-III, é similar à lectina de *Pseudomonas aeruginosa* PA-III que contribui para agregação das células, especificidade pelo hospedeiro e virulência da bactéria.

Esta é outra possível explicação pela adesão preferencial de *E. coli* O157:H7 às bordas cortadas das folhas de alface. Esse fato pode ser associado com a interação das lectinas presentes na superfície celular da bactéria com carboidratos específicos que extravasaram dos tecidos danificados da folha de alface. Células agregadas foram observadas nas fotomicrografias.

A similaridade entre lectina presente em microrganismos patogênicos de vegetais e lectina de patógenos humanos é, portanto, mais um paralelo merecedor de atenção para auxiliar a decifrar os mecanismos de adesão de bactérias patogênicas humanas nas superfícies das hortaliças (SOLOMON; BRANDL; MANDRELL, 2006).

Abaixo da camada hidrofóbica coberta pelas ceras há a cutícula, uma estrutura porosa, hidratada, que pode ser uma rota de penetração hidrofílica. Portanto, lesões superficiais rompem a proteção natural e expõem estruturas que proporcionam aos



microrganismos abrigo e fornecimento de água e de nutrientes (AXTELL; BEATTIE, 2002).

Brandl (2008) estudou o efeito de diferentes lesões superficiais nas folhas de alface no crescimento de *E. coli* O157:H7, tendo em vista a segurança alimentar. Observou-se que após 4 horas da inoculação, a população aumentou 4,0, 4,5 e 11 vezes nas folhas de alface que foram, respectivamente, danificadas mecanicamente, cortadas em grandes pedaços ou fatiadas. Durante o mesmo intervalo de tempo, a população de *E. coli* O157:H7 aumentou apenas duas vezes nas folhas que estavam intactas após a colheita. O autor concluiu que o manuseio é fator que deve ser considerado para o desenvolvimento das atuais boas práticas agrícolas e protocolos de planos APPCC, considerando-se que os numerosos surtos de infecções causados por essa bactéria estão ligados ao consumo de hortaliças folhosas minimamente processadas e à baixa dose infecciosa de *E. coli* O157:H7 para humanos. Há ainda oportunidade de *E. coli* O157:H7 multiplicar-se em nichos presentes na superfície foliar da alface no período pós-colheita e que o crescimento da população ocorre num prazo curto. Portanto, esses fatos devem ser considerados em estudos de avaliação de risco.

## **4.2. Caracterização dos usuários e hábitos de consumo de alface nos restaurantes comerciais**

Os dados coletados das folhas de respostas preenchidas pelos clientes dos restaurantes foram organizados e classificados. Uma tabela foi estruturada com as frequências de cada resposta dos usuários dos restaurantes que responderam ao questionário. A partir das frequências das repostas de cada questão foram construídos os gráficos.

### **4.2.1. Classificação dos usuários por sexo e por faixa etária**

Dentre a população usuária investigada nos sete restaurantes, 227 pessoas responderam ao questionário. Esta população amostrada de respondentes foi classificada por sexo e faixa etária. Dentre os 227 entrevistados, 133 pessoas (58,6%) eram do sexo feminino e 94 (41,4%) do sexo masculino (Figura 11).

Na classificação por idade e sexo (Figura 12), observou-se que 38 pessoas (16,7%) tinham idade entre 10 e 19 anos, sendo 25 pessoas (11%) do sexo feminino e 13 (5,7%) do sexo masculino. Adultos entre 20 e 39 anos, a maior faixa amostrada dentre os respondentes, eram de 135 pessoas (59,5%), sendo 83 do sexo feminino (36,6%) e 52 do sexo masculino (22,9%). Na classificação de idade entre 30 e 39 anos, havia 27 pessoas, sendo 13 do sexo feminino (11,9%) e 14 do sexo masculino (6,2%). Acima de 40 anos,

havia na população amostrada 27 pessoas, sendo 12 do sexo feminino (11,9%) e 15 do sexo masculino (6,6%).

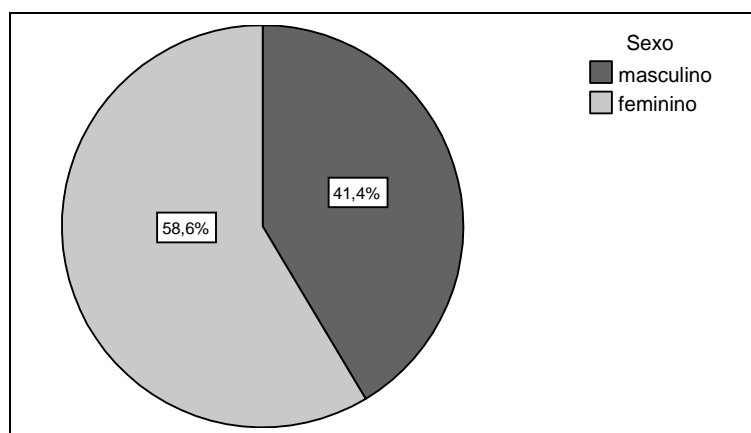


Figura 11 - Percentual de usuários dos restaurantes comerciais, classificados por sexo.

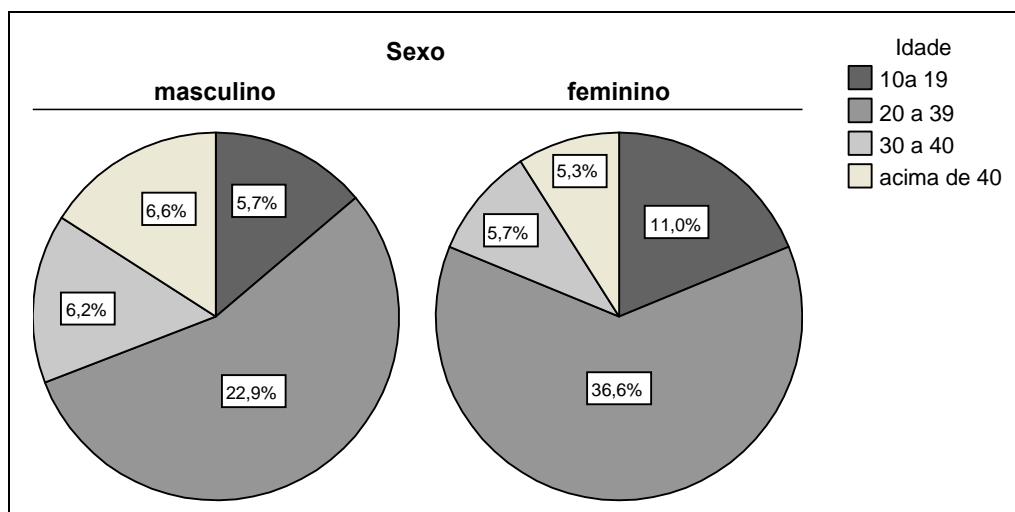


Figura 12 - Distribuição em porcentagens de usuários dos restaurantes comerciais classificados por sexo e idade.

As classificações por sexo e por idade permitiram concluir que maior parte da população amostrada foi composta por jovens adultos com idade entre 20 e 29 anos, com predomínio do sexo feminino.

#### 4.2.2. Consumo de alface pelos usuários dos restaurantes

A pesagem das porções de alface consumida pelos usuários indicou que a porção pequena pesa em média 8,0 g, a porção média 20,0 g e a porção grande 30,0 g.

Do total de 227 entrevistados, 108 pessoas (47,6%) consomem a porção pequena de alface, estimada em 8,0 g (Figura 13). A porção média de alface, estimada em 20,0 g,

foi consumida durante o período de avaliação por 98 pessoas (43,2%). Já a porção grande, estimada em 30,0 gramas de alface, foi consumida por 17 pessoas (7,5%) dos usuários. Somente 4 pessoas (1,8%) afirmaram não consumir alface em suas refeições.

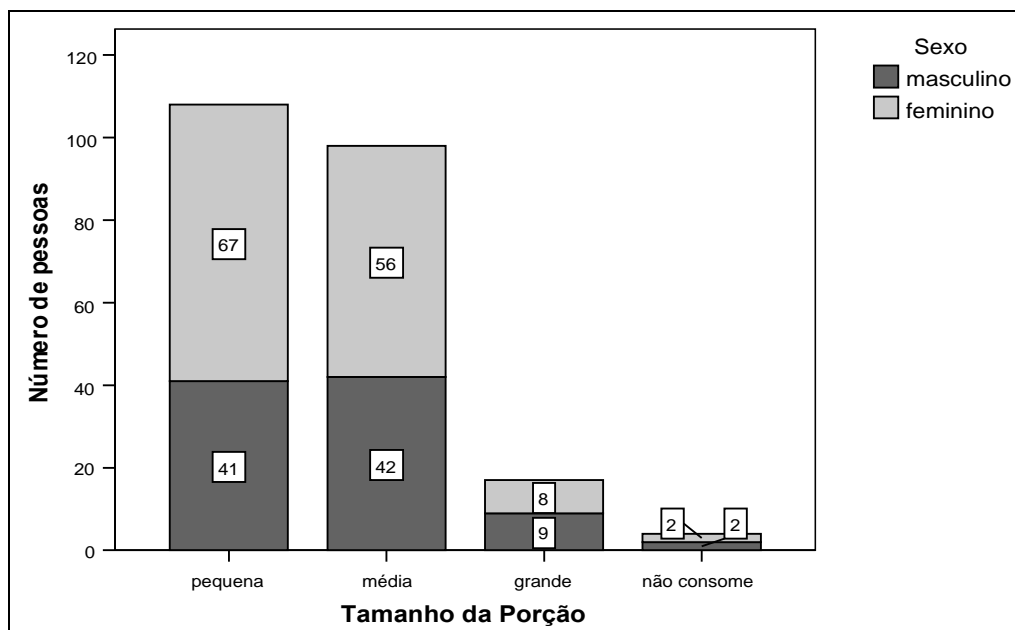


Figura 13 - Tamanho da porção de alface consumida por usuários dos restaurantes comerciais em razão do sexo.

Dentre a população do sexo masculino, 41 pessoas (44,7%) consomem porções pequenas e 42 pessoas (44,7%) consomem porções de tamanho médio de alface. As porções de tamanho grande foram consumidas por nove usuários do sexo masculino, correspondendo 9,6% deles. Duas pessoas do sexo masculino informaram que não consomem alface.

Sessenta e sete mulheres (51,1%) consomem porções pequenas e 56 (42,1%) consomem porções médias. Portanto, as porções pequenas e médias são consumidas por 93,2 % das usuárias dos restaurantes. As porções grandes são consumidas por 6,0% (8) das mulheres usuárias dos restaurantes. Duas pessoas do sexo feminino informaram que não consomem alface.

Os consumidores esporádicos de alface que o consomem uma a três vezes por semana também o consomem em porções pequenas. As porções médias são também consumidas, mas por menos de 10% deles (Figura 14).

Observou-se que, quando a frequência de consumo aumentou, o tamanho da porção também foi maior. Por exemplo, as porções médias foram consumidas por um maior número de usuários, entre 15 e 25% dos que consomem alface de quatro a cinco vezes por semana. As pessoas que consomem alface seis a sete vezes por semana

também consomem a maioria das porções grandes observadas nesta pesquisa. Mais de 40% das pessoas que consomem seis vezes por semana e 25% dos que consomem sete vezes por semana, manifestaram o quão intensamente gostam e consomem a alface.

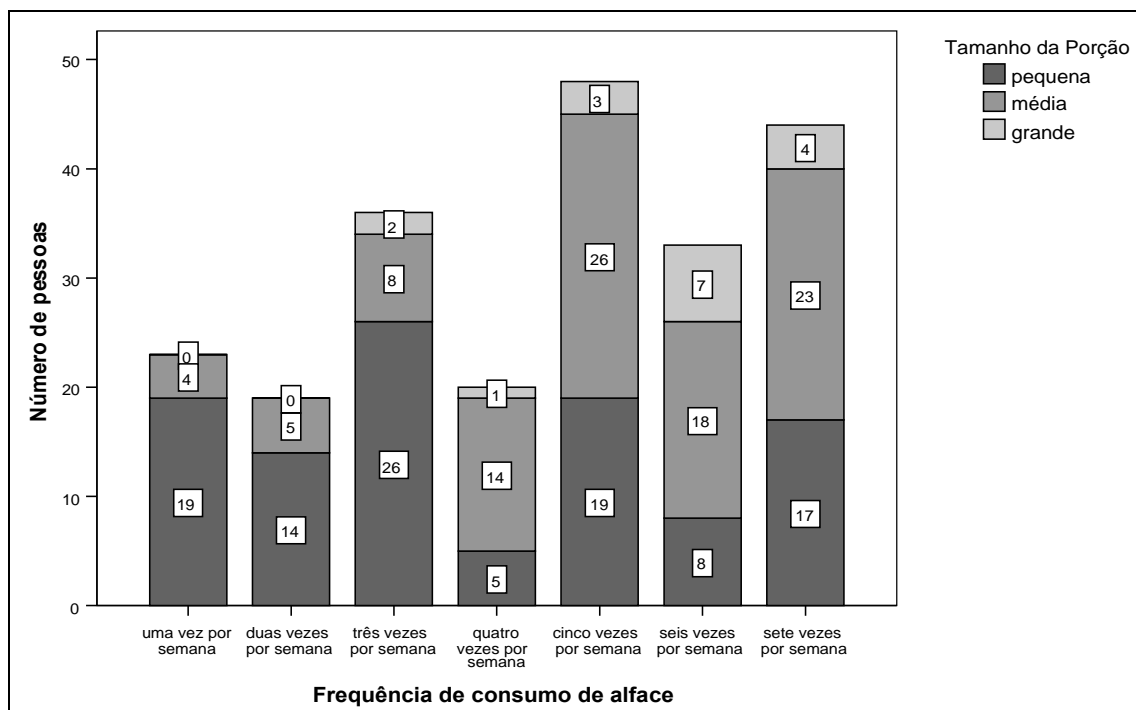


Figura 14 - Interação entre a frequência de consumo de alface nos restaurantes comerciais e tamanho da porção consumida.

Observou-se que 98,2% (233) dos entrevistados consumiam alface e que apenas 1,8% (4) deles não consomem. Dentre essas pessoas, 55% (125) consomem alface cinco a sete vezes por semana, sendo mulheres 55,6% (74) e homens 54,2% (51). Os dados sobre a distribuição da frequência de consumo de alface entre os sexos estão apresentados na Figura 15.

Os dados indicaram que a alface tem boa aceitação pelos usuários dos restaurantes, por pessoas de ambos os sexos, havendo pouca diferença de consumo entre eles. Na Figura 16, a seguir, é apresentado o gráfico da frequência de consumo de alface pela faixa etária dos usuários dos restaurantes.

A faixa etária entre 10 e 19 anos compreendeu 38 respondentes. Em relação às frequências mais baixas, cinco pessoas informaram que consomem alface uma vez por semana, quatro consomem alface duas vezes e, sete pessoas informaram que consomem alface três vezes por semana. Uma pessoa informou que consome alface quatro vezes por semana. O consumo de cinco vezes por semana foi informada por seis pessoas. E a frequência de consumo de alface seis e sete vezes por semana foi informada por sete pessoas.

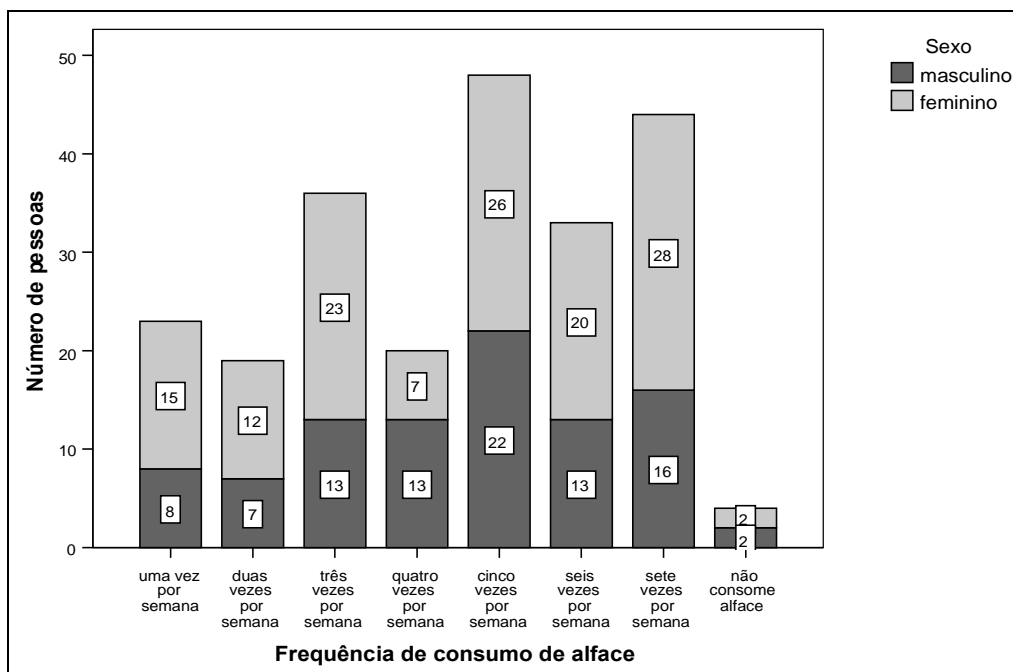


Figura 15 - Distribuição da frequência do consumo da alface por homens e mulheres nos restaurantes comerciais.

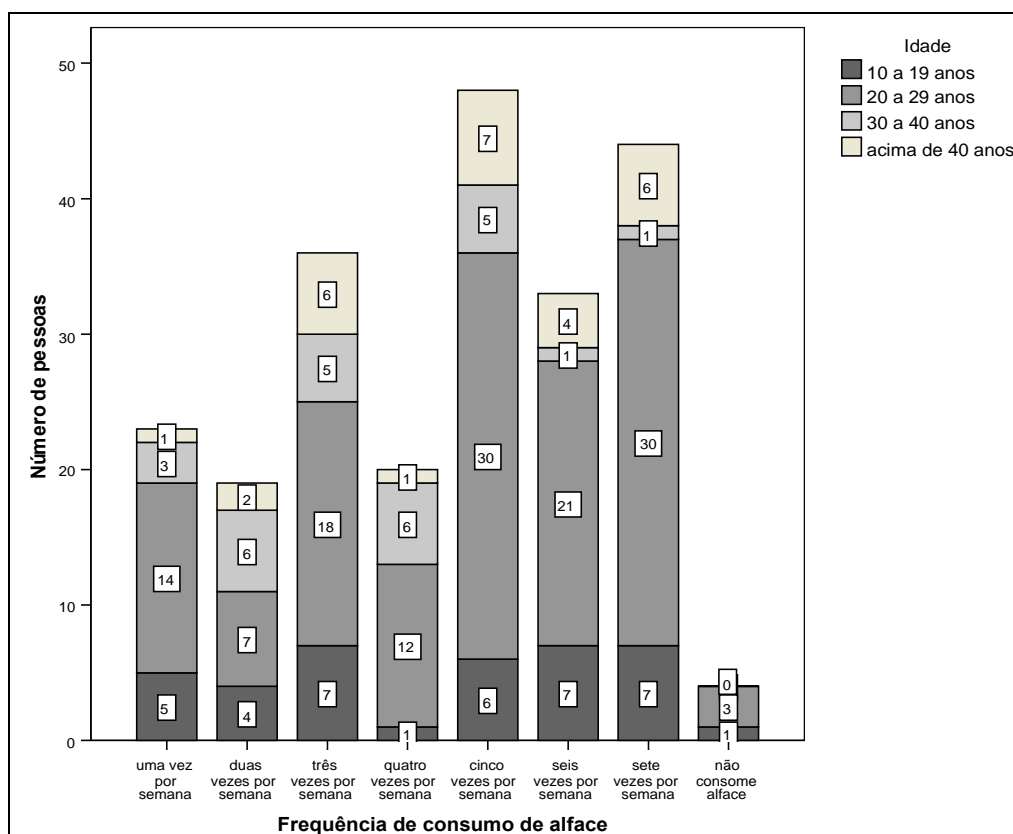


Figura 16 - Consumo da alface pelos usuários dos restaurantes comerciais por semana versus idade dos usuários.

Entre 20 e 29 anos participaram 135 respondentes. Os dados revelaram que 81 pessoas que estão nessa faixa etária consomem alface 5 a 7 vezes por semana. Elas representam 36,32% do total dos usuários entrevistados e 30 delas, representando 13,45%, consomem alface três a quatro vezes por semana. Porém, três pessoas que não consomem alface estão nessa faixa etária.

Entre 30 e 40 anos participaram 27 respondentes. Observou-se que a maioria dos entrevistados que informaram estar nesta faixa etária consome alface entre uma a quatro vezes por semana. Somente cinco deles consomem alface cinco vezes por semana. Entre seis e sete vezes por semana foi identificado somente um usuário em cada uma dessas frequências.

Vinte e sete respondentes eram pessoas acima de 40 anos. Nesta faixa etária, a frequência do consumo de alface voltou a aumentar. Isso porque 10 pessoas informaram que consomem alface uma a quatro vezes por semana, mas, 17 dos que estão nesta faixa etária consomem alface cinco a sete vezes por semana.

Os dados desta pesquisa informaram que a alface tem boa aceitação, sendo consumida por pessoas de diferentes faixas etárias e por ambos os sexos.

Por razões nutricionais e de saúde, observaram-se entre todas as populações do mundo uma tendência a aumentar o consumo de alimentos frescos. De acordo com informações da Organização Mundial da Saúde, estão ocorrendo mudanças significativas nos padrões de consumo de alimentos. Há aumento constante do consumo de produtos frescos como parte de uma dieta regular. Esses novos padrões de consumo carregam riscos novos ou emergentes e, por isso, requerem avaliação periódica (WHO, 2008).

Porém, surtos de infecções humanas associados ao consumo de hortaliças e frutas cruas aumentaram nos últimos anos, devido a fatores como mudanças nas práticas agrícolas e de processamento, mas, principalmente, por causa do aumento do *per capita* consumido. Isto porque porções maiores carregam, também, maiores quantidades do perigo presente (BEUCHAT, 2002).

#### **4.2.3. Hábitos de higiene entre os usuários dos restaurantes**

O mesmo percentual (48,9%), sendo 46 homens e 65 mulheres, respondeu “sim”, que eles têm o hábito de lavar as mãos antes da refeição (Figura 17). A opção “às vezes” foi a resposta de 35,1% dos homens, sendo 33 deles, e 39,8% das mulheres, 53. Portanto, afirmaram que não lavavam as mãos antes das refeições 16,0% dos homens (15) e 11,3% das mulheres, sendo também 15 delas.

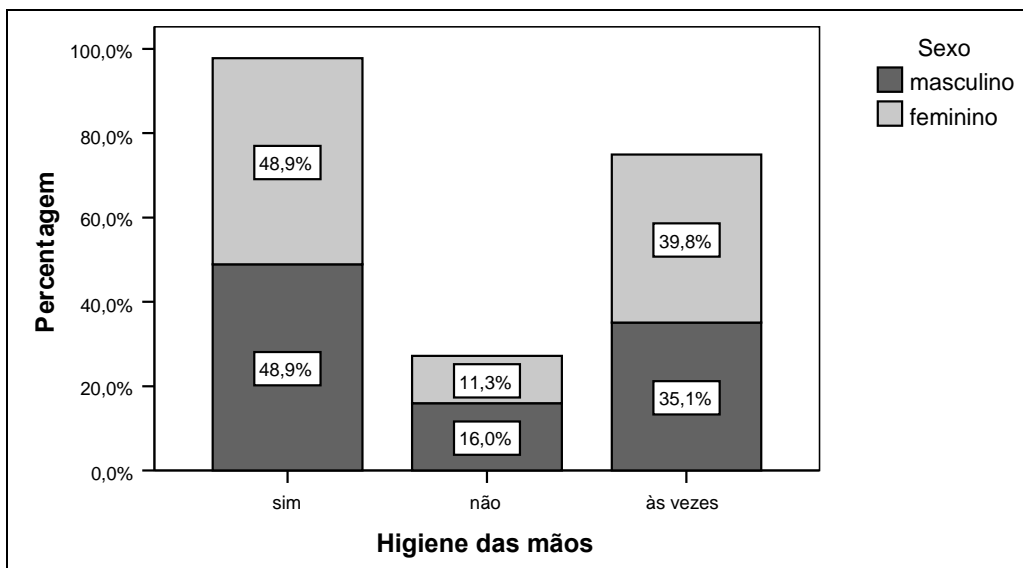


Figura 17 - Hábito de lavar entre os usuários dos restaurantes comerciais.

Nesta pesquisa, o hábito de lavar as mãos antes das refeições foi o único comportamento investigado em relação aos hábitos de higiene do consumidor. Informaram que não lavavam as mãos 27,3% dos respondentes. O interessante é que nos três restaurantes onde esta pesquisa foi realizada havia pia abastecida de água, sabão e papel-toalha. Para Momesso (2002), as pias para higienização de mãos devem ser colocadas em locais estratégicos. Um desses locais deve ser onde há fluxo de pessoas, pois, induzem certo número de pessoas a lavarem as mãos. O autor estava referindo-se às áreas de produção de alimentos. Este conceito é aplicável, também, às áreas de distribuição dos alimentos dos restaurantes. Por exemplo, em um dos restaurantes investigados a pia estava localizada nos fundos da área de distribuição. Portanto, eram necessários deslocamento e movimento contrafluxo para voltar de lá. Certamente, menos pessoas são incentivadas a lavar as mãos.

O consumidor constitui o último elo da cadeia do campo à mesa, e seu comportamento pode evitar doenças de origem alimentar. Portanto, conhecer e compreender a prevalência do comportamento que o expõe a algum risco pode auxiliar no desenvolvimento de programas educacionais eficazes (ZHANG; PENNER et al., 1999).

Contudo, devem ocorrer na população outros hábitos que podem comprometer a saúde. Segundo McCarthy et al. (2007), muitos são os que ainda tomam decisões sobre o consumo, estocagem e preparo de alimentos aquém do ideal, em relação às perspectivas de saúde e segurança alimentar. Também, observou que em certas circunstâncias, fatores como tradição, hábito, prazer ou restrições financeiras podem ser condições mais imperativas do que risco de doença.

#### 4.2.4. Ocorrência de diarreia

A ocorrência recente de diarreia foi afirmada por 23 pessoas (10,1%) usuárias dos restaurantes (Figura 18). A causa da diarreia só era conhecida por 4%, ou seja, apenas uma pessoa afirmou que sabia a causa. E somente ela procurou cuidados médicos por causa desse sintoma de doença de origem alimentar.

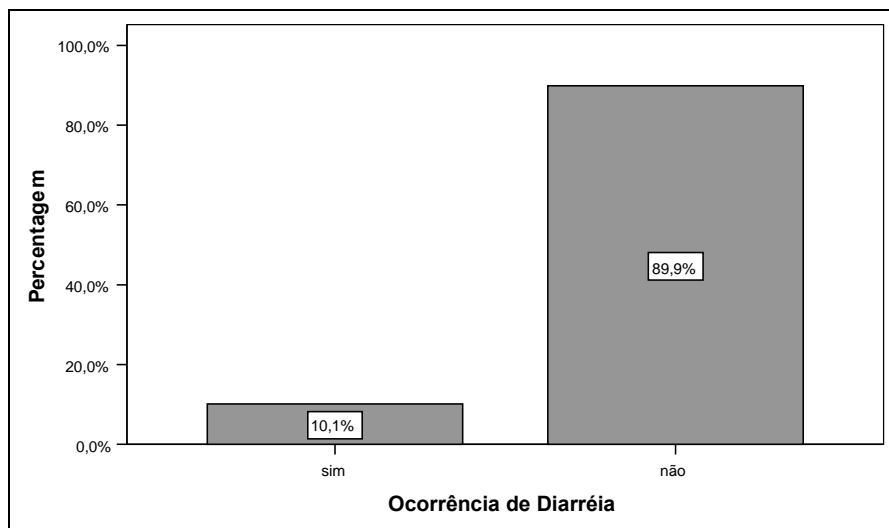


Figura 18 - Frequência da ocorrência de diarreia dentre os usuários dos restaurantes comerciais.

A ocorrência de diarreia foi proporcionalmente menor dentre os usuários esporádicos dos restaurantes (Figura 19). Foi revelado que quatro dos que frequentam o restaurante uma vez por semana tiveram diarreia em período recente à pesquisa. E que somente uma pessoa que frequenta restaurante duas vezes e duas das que frequentavam três vezes por semana tiveram diarreia.

O número de casos de diarreia foi maior entre os usuários assíduos do que os esporádicos. Além disso, o número de pessoas acometidas aumentou de acordo com a frequência ao restaurante. Três pessoas que frequentavam até quatro vezes por semana informaram que tiveram diarreia.

Seis pessoas, dentre as que frequentavam os restaurantes, até cinco vezes por semana, informaram que foram acometidas por diarreia, assim como cinco das que frequentavam seis vezes por semana e duas das que frequentavam sete vezes por semana.



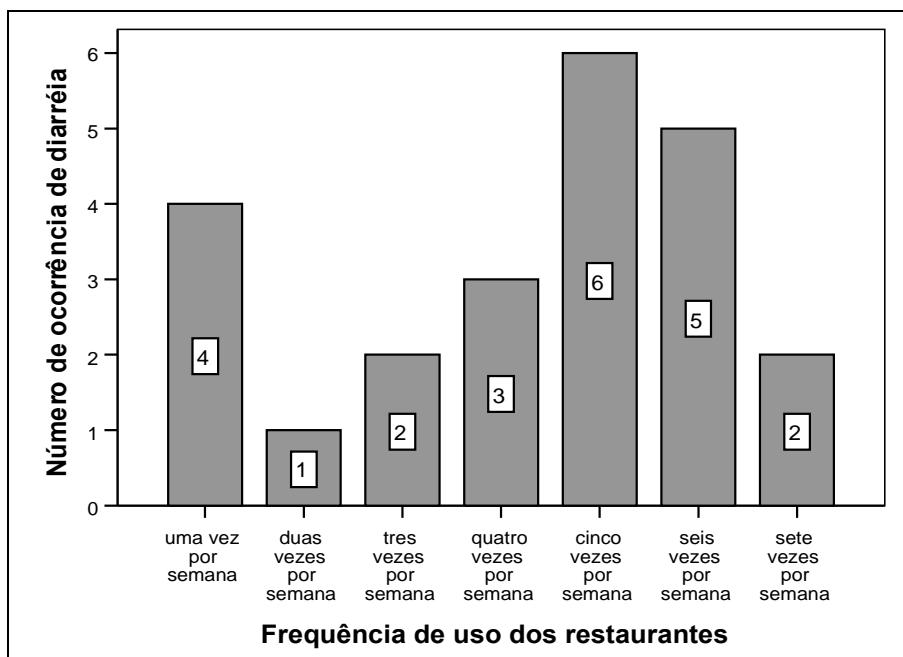


Figura 19 - Relação entre frequência de usuários de restaurantes comerciais e ocorrência de diarreia.

Não foi constatado nenhum surto de doença de origem alimentar durante o período de realização dessa pesquisa. Porém, o segmento de refeições coletivas responde por uma parcela de responsabilidade na saúde pública, à medida que afeta a saúde e o bem-estar das pessoas com a qualidade dos alimentos que produz. A produção comercial de alimentos é uma atividade relativamente nova. E a gestão da qualidade na maioria dos estabelecimentos alimentícios brasileiros pode ser considerada, ainda, rudimentar. Uma das razões é o mercado pouco exigente. A ideia de que manipulação de alimentos é uma atividade simples, que não demanda tecnologia, uma vez que a preparação dos alimentos no ambiente doméstico é assim realizada, prevalece em muitas áreas (SILVA JUNIOR, 2007).

As doenças de origem alimentar dependem de recursos financeiros, com cuidados à saúde e constitui, em dias atuais, uma preocupação para os consumidores, produtores e órgãos responsáveis pela saúde pública (PANISELLO et al., 2000).

### **4.3. Condições higiênicas de processamento em restaurantes comerciais**

#### **4.3.1. Avaliação da qualidade microbiológica do ar dos restaurantes**

Os ambientes não refrigerados corresponderam às áreas internas dos setores de preparo de alimentos dos restaurantes onde ocorreram as etapas de limpeza, sanitização e manipulação das hortaliças para as saladas. Os ambientes refrigerados

compreenderam, em todos os restaurantes avaliados, os balcões de serviços de exposição do bufê saladas situados na área de acesso do cliente.

As contagens microbianas foram superiores às recomendadas para os ambientes não refrigerados dos sete restaurantes. Comparando-se os resultados entre os tipos de microrganismos investigados, o ar dos ambientes de trabalho apresentou médias de contagens maiores para fungos filamentosos e leveduras que microrganismos mesófilos aeróbios, na maioria dos restaurantes com exceção do restaurante B (Figura 20). A contaminação do ar por esses microrganismos foi constante durante o período de realização da pesquisa, como se observado pelos desvios-padrão das médias resultantes das contagens.

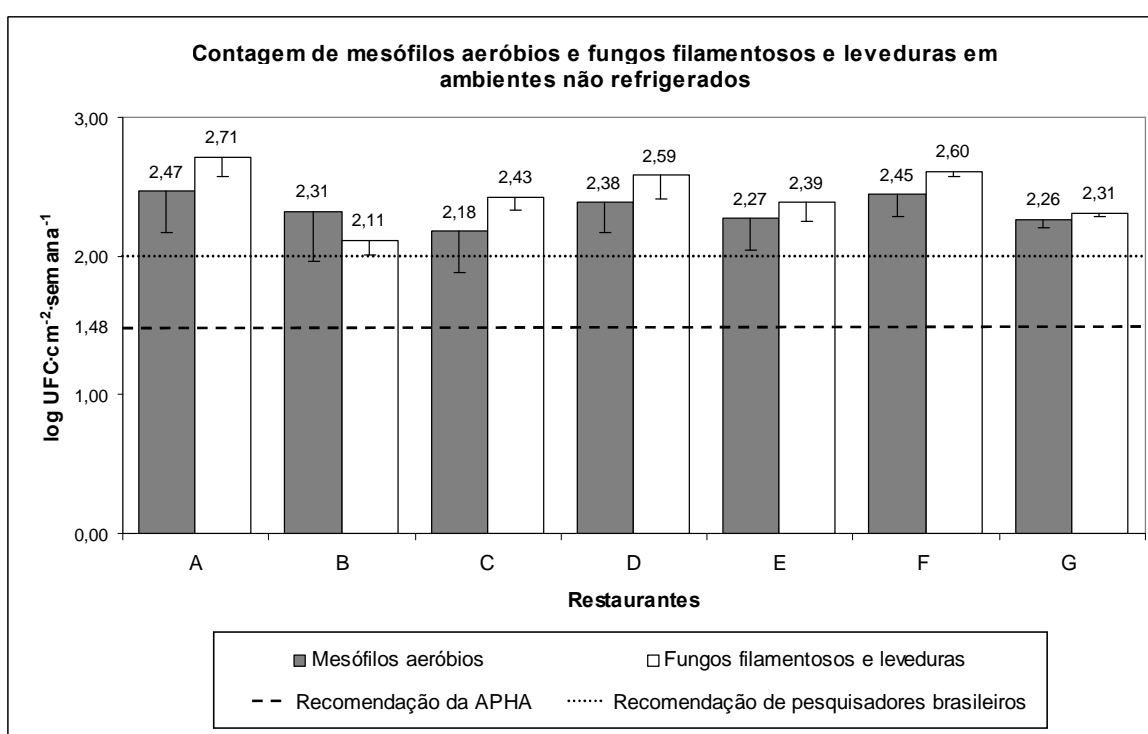


Figura 20 - Médias das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras obtidos pela técnica da sedimentação simples, expressadas em  $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{semana}^{-1}$ , do ar dos ambientes não refrigerados dos restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, MG. As barras representam o desvio-padrão da média.

Estes resultados são diferentes dos informados por alguns pesquisadores. Por exemplo, Fidélis (2005) informou sobre a qualidade microbiológica do ar de cinco restaurantes industriais institucionais do Espírito Santo, onde foram avaliados 13 ambientes não refrigerados. Os resultados apresentaram maiores contagens para microrganismos mesófilos aeróbios, em média,  $2,10 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{semana}^{-1}$ , do que para

fungos filamentosos e leveduras, que apresentaram contagens médias de  $2 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$ .

Silva e Netto (2003) avaliaram 12 restaurantes industriais da Zona da Mata e Metalúrgica de Minas Gerais. O ar dos ambientes de processamento dos restaurantes investigados apresentou contagens maiores para mesófilos aeróbios que para fungos e leveduras, sendo as médias das contagens de  $2,33 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$  e  $2,02 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$ , respectivamente.

Um fato que pode ter influenciado nos resultados dessa pesquisa é que os restaurantes também funcionam com outra atividade. No período da noite atuam como pizzaria, inclusive, com serviços de entrega. O restaurante B possui esse tipo de serviço, mas, em outra área separada. Portanto, não ocorre no mesmo espaço o preparo de refeições e de saladas. De modo geral, o local de preparo de saladas não é separado da cocção e há vapores, umidade e atividade de pessoal. Além disso, em todos os restaurantes, os locais são pouco ventilados. Observou-se que os locais refrigerados dos restaurantes A, B, F e G apresentaram maiores contagens para microrganismos mesófilos aeróbios do que para fungos filamentosos e leveduras (Figura 21). E o restaurante D mostrou contagens iguais para mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras. Estes resultados estão diferentes dos informados por Fidélis (2005) e por Silva (1996). Nessa pesquisa, os setores refrigerados apresentaram contagens maiores para fungos e leveduras que para mesófilos aeróbios.

Os restaurantes C e E apresentaram contagens dentro das recomendações de pesquisadores brasileiros de até  $2 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$  para mesófilos aeróbios. O restaurante C apresentou contagens médias de  $1,93 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$  e o restaurante E  $1,87 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{semana}^{-1}$ . Porém, as contagens de fungos filamentosos e leveduras desses mesmos restaurantes ultrapassaram as recomendações mais flexíveis de pesquisadores brasileiros.

Amostragens usando-se volume de ar, como no método de impressão em ágar, podem ser mais eficientes que o método de sedimentação simples utilizado nessa pesquisa para obtenção de resultados quantitativos e qualitativos. Isso ocorreu porque o método da sedimentação fundamenta-se somente na força da gravidade e nas correntes de ar para a deposição das partículas. Porém, a grande proporção de fungos filamentosos e leveduras e de mesófilos aeróbios no ambiente de processamento veio de informações consistentes. Daí, a importância dessa técnica para avaliar as condições higiênicas de processamento dos restaurantes.

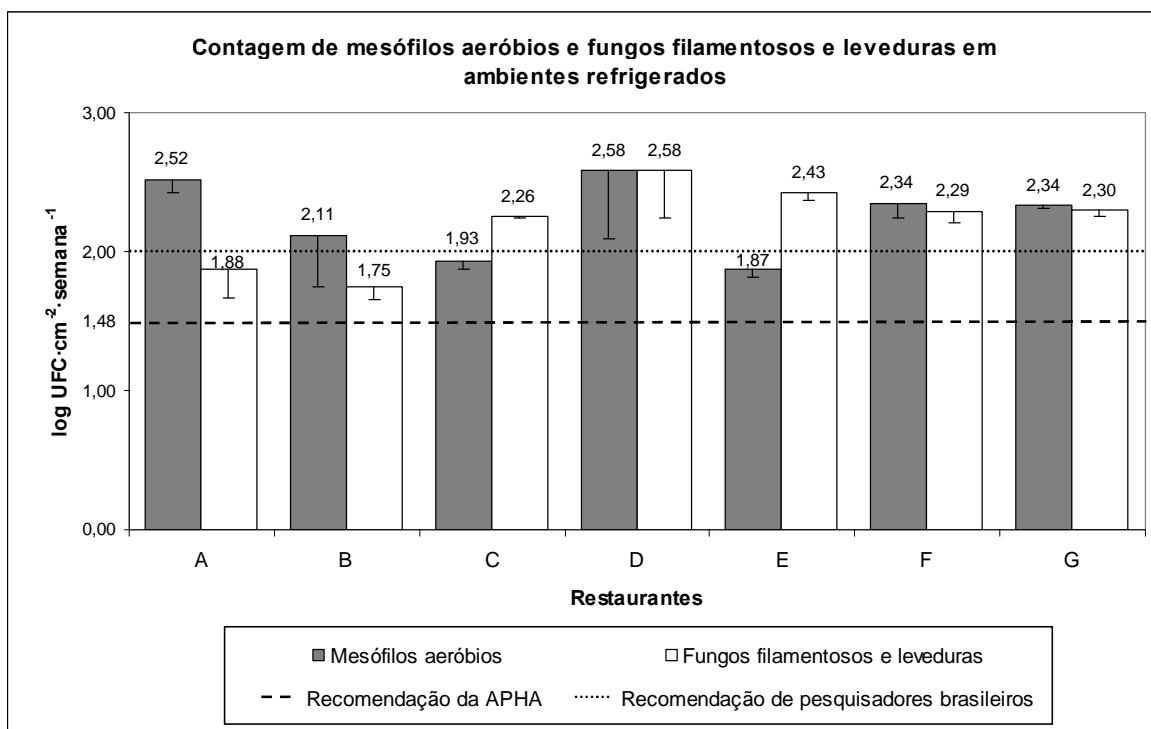


Figura 21 - Médias e desvios-padrão das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras obtidos pela técnica da sedimentação simples e expressados em  $\log \text{UFC-cm}^{-2}\text{-semana}^{-1}$  do ar dos ambientes refrigerados dos restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, MG. As barras representam o desvio-padrão da média.

As diferenças entre os ambientes refrigerados e não refrigerados são temperatura, umidade, ventilação e atividade de pessoal. Os balcões de autosserviço possuem temperaturas mais baixas e estão em locais ventilados. Também, não há vapores, são menos úmidos do que local de preparo de alimentos. Porém, a atividade humana é mais intensa devido ao movimento de clientes. Esta pode ser a possível causa de maiores contagens de mesófilos aeróbios nos ambientes refrigerados.

Não há dúvidas de que os resultados foram, portanto, capazes de apontar diretrizes para ações que podem melhorar a qualidade microbiológica do ar dos restaurantes. Por exemplo, nos ambientes de processamento que predominaram fungos filamentosos e leveduras podem ser utilizados sanitizantes à base de quaternários de amônio como principal agente no controle microbiológico. Onde são predominantes os microrganismos aeróbios mesófilos, os sanitizantes à base de cloro podem ser os recomendados. Além disso, como as contagens nos ambientes investigados estão altas, os sanitizantes podem ser utilizados em esquemas de rodízio. O monitoramento, realizado por meio de análises periódicas do ar, pode verificar a eficiência do

procedimento adotado para higienização do ar, assim como determinar a frequência da realização.

#### 4.3.2. Avaliação das condições higiênicas das mãos de manipuladores da salada de alface em sete restaurantes comerciais

Na Figura 22 estão apresentadas as médias e os desvios-padrão das médias das contagens de coliformes e mesófilos aeróbios obtidos pela técnica do *swab* e expressos em UFC/mão de mãos de manipuladores de saladas de sete restaurantes comerciais da cidade de Viçosa, Minas Gerais.

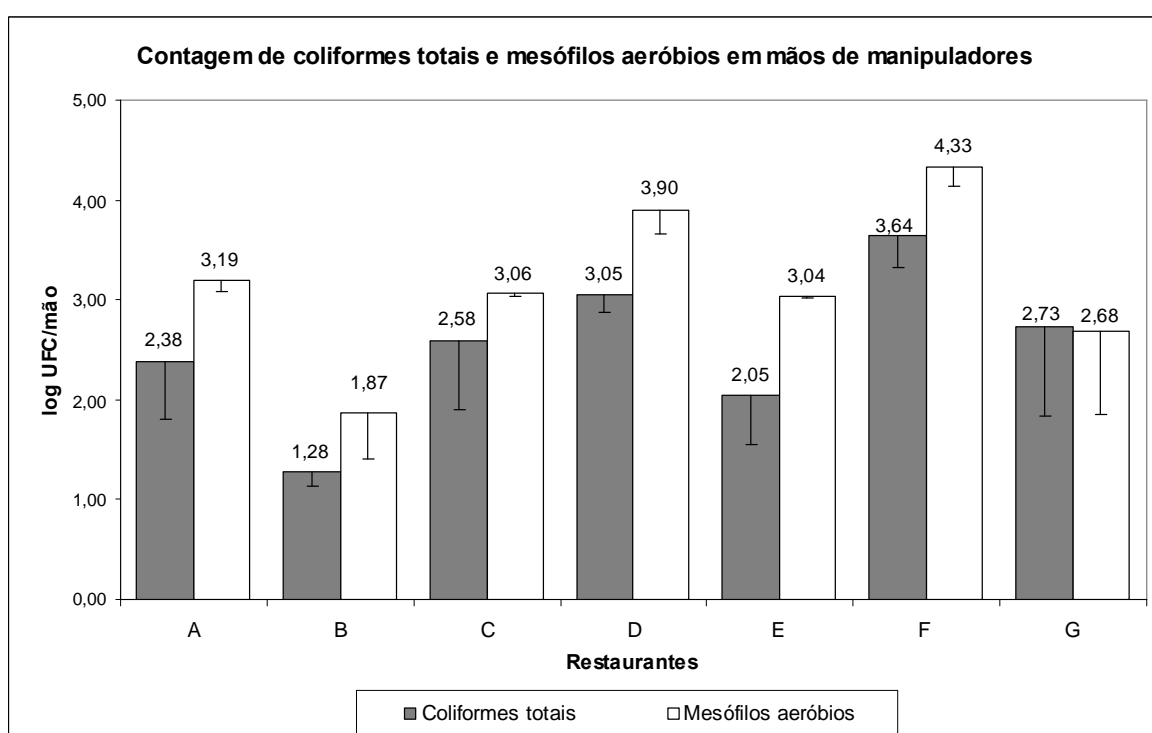


Figura 22 - Médias e desvios-padrão das contagens de coliformes e de mesófilos aeróbios obtidos pela técnica do *swab* e expressados em log UFC/mão de mãos de manipuladores de salada de sete restaurantes comerciais de Viçosa, MG. As barras representam o desvio-padrão da média.

Em relação a coliformes, os resultados das contagens das mãos dos manipuladores dos restaurantes A, C, E e G foram de até 3 log UFC/mão. Dos restaurantes D e F, as contagens foram de até 4 log UFC/mão. Com relação a coliformes totais, o manipulador de saladas do restaurante F apresentou a contagem mais alta, atingindo 3,64 log UFC/mão, e o manipulador do restaurante B, as contagens mais baixas que corresponderam a 1,28 log UFC/mão.

Nas contagens de mesófilos aeróbios, somente um manipulador do restaurante B apresentou contagens menores que 2 log UFC/mão. Os do restaurante G mostraram contagens até 3 log UFC/mão, e os dos restaurantes A, C, D, e E até 4 log UFC/mão, sendo que o manipulador do restaurante F apresentou contagens de mesófilos aeróbios acima de 4 log UFC/mão.

A contagem mais baixa de mesófilos aeróbios, < 2 log UFC/mão, foi apresentada pelo manipulador do restaurante B, que foi de 1,87 log UFC/mão. As contagens mais altas, sendo > 4 log UFC/mão, foram apresentadas pelo manipulador do restaurante F. Somente o manipulador do restaurante B apresentou resultados de < 2 log UFC/mão para ambos os microrganismos investigados.

Bactérias do grupo coliformes fecais não compõem a microbiota residente da superfície corporal humana. Portanto, a pesquisa desses microrganismos em manipuladores é justificada porque compõem a microbiota transiente. A presença de coliformes de origem fecal em mãos de manipuladores caracteriza uma situação de risco potencial devido à relação desse grupo de bactérias e a possível ocorrência de patógenos entéricos humanos (ICMSF, 1991). Por exemplo, Silva e Netto (2003) investigaram a presença de coliformes nas mãos e unhas de 25 manipuladores de alimentos de restaurantes comerciais e constataram que 60% estavam contaminadas. Os microrganismos foram identificados e, dentre os que tiveram incidência mais alta, estavam bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella*.

A presença de coliformes pode ser utilizada como um indicador de contaminação, infecção ou de condutas pessoais inadequadas. Os resultados são válidos, como monitoramento do procedimento de higiene das mãos, quando as amostras são coletadas após a higienização dessas (KORNACKI; JOHSON, 2001).

Nessa pesquisa, a classificação da contaminação observada em faixas permitiu comparar a qualidade higiênica e forneceu diretrizes para ações corretivas do procedimento de higienização, podendo instigar o estabelecimento de metas alcançáveis. Resultados com essa classificação podem vir seguidos de simbologia de cor indicando a situação do resultado obtido na avaliação. Por exemplo, verde para resultados < 2 log UFC/mão, amarelo para < 3 log UFC/mão e vermelho para > 3 log UFC/mão. O impacto visual da sinalização junto aos resultados motiva e conduz a busca de resultados melhores pelo próprio manipulador.

As fontes potenciais de contaminação de alimentos consumidos crus, após a limpeza e sanitização, incluem a manipulação e o contato com as superfícies de recipientes e utensílios. A higiene pessoal, particularmente, a higiene das mãos, é fundamental para reduzir a contaminação dos alimentos e minimizar os riscos da ocorrência de doenças de origem alimentar (REDIERS et al., 2008).

#### 4.3.3. Avaliação das condições higiênicas de superfícies de equipamentos e utensílios utilizados no preparo de salada

Os resultados foram comparados com recomendações de EVANCHO et al. (2001), que sugerem contagens de até 0,3 log UFC·cm<sup>-2</sup> para microrganismos mesófilos aeróbios para superfícies adequadamente higienizadas e de pesquisadores brasileiros, que recomendam até 1,7 log UFC·cm<sup>-2</sup>.

Os utensílios analisados foram somente os que entraram em contato com a alface. Dos sete investigados, os restaurantes C e E não utilizaram a bacia durante o preparo da salada de alface (Figura 23). Este fato indicou que esses restaurantes não realizaram a etapa de sanitização no período de realização dessa pesquisa. Comparando os valores obtidos das contagens dos microrganismos investigados em todos os restaurantes que utilizaram bacia, a contagem de mesófilos aeróbios estava acima das recomendações.

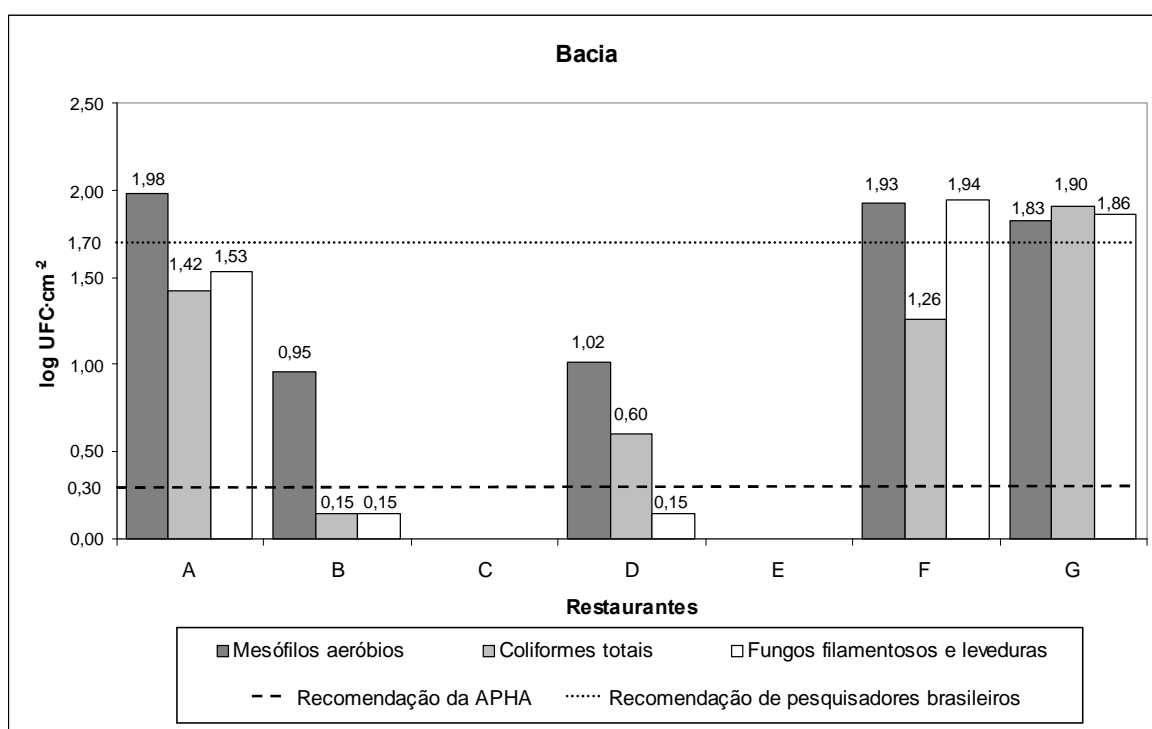


Figura 23 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de bacias utilizadas no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.

Somente a bacia do restaurante B apresentou contagens inferiores a 0,30 log UFC·cm<sup>-2</sup> nas contagens de coliformes e de fungos e leveduras, atendendo às recomendações.

Em relação às recomendações de pesquisadores brasileiros, as bacias utilizadas pelos restaurantes B e D estão classificadas como higienizadas.

A tábua de corte foi utilizada apenas pelos restaurantes A e B. Os logaritmos das contagens dos microrganismos investigados estavam acima das recomendações da APHA (Figura 24). As análises revelaram que as contagens de coliformes totais foram mais baixas que as contagens dos outros dois microrganismos investigados. Porém, as contagens de fungos filamentosos e leveduras foram, ainda, mais altas que as de mesófilos aeróbios, em ambos restaurantes, extrapolando os limites estabelecidos pelas recomendações brasileiras.

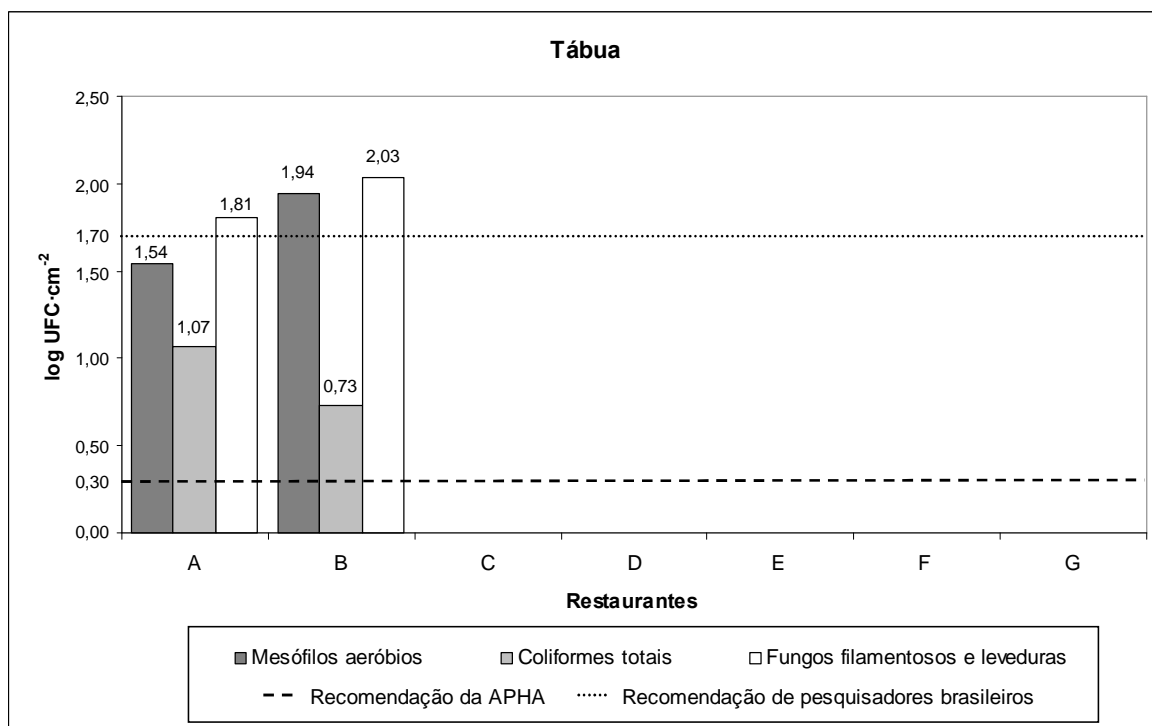


Figura 24 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de tabuas utilizadas no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.

A faca foi utilizada para o corte da alface em todos os restaurantes investigados. De modo geral, apresentou contaminação elevada, estando os resultados para fungos filamentosos e leveduras do restaurante B estavam dentro das recomendações da APHA. A faca do restaurante A apresentou contagens, para os microrganismos analisados, abaixo do limite estabelecido (Figura 25).

O escorredor foi utilizado por dois restaurantes na etapa final do processamento. Ambos os escorredores, do restaurante D e do G, apresentaram contagens mais altas que as recomendações da APHA para os três microrganismos investigados. Também, as contagens estavam mais altas que as recomendações brasileiras e, portanto, apresentavam-se em condições higiênicas insatisfatórias (Figura 26).



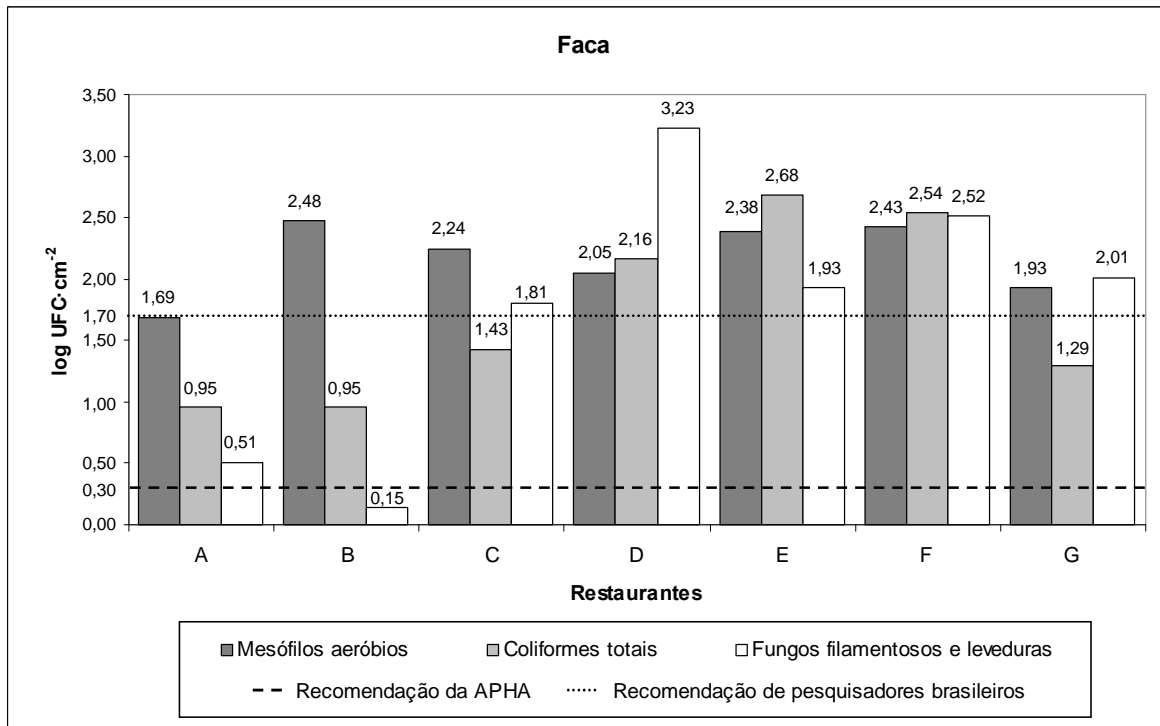


Figura 25 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de facas utilizadas no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.

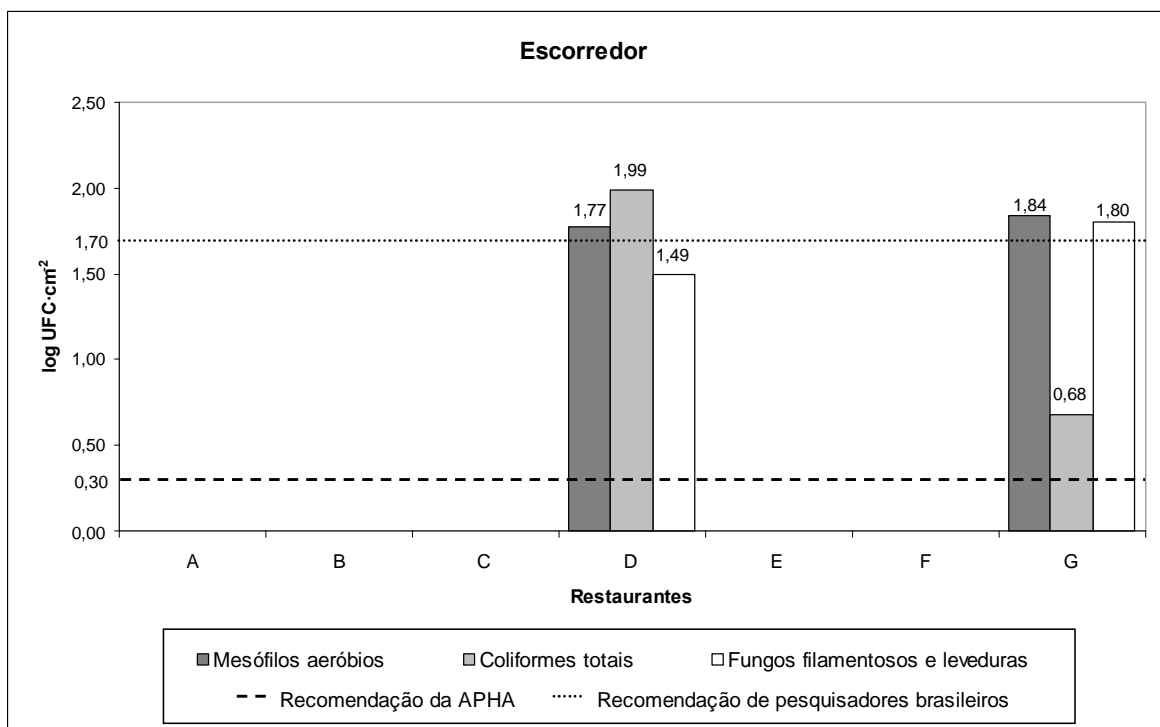


Figura 26 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de escorredores utilizados no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.

As cubas são os recipientes que contêm as saladas durante a exposição para consumo e consistiram de diferentes materiais. Nos restaurantes B e E eram de vidro, e, nos demais de aço inoxidável. A expectativa era de que nesses utensílios as contagens microbianas fossem as mais baixas dentre os equipamentos avaliados e atendessem às recomendações. As cubas dos restaurantes A, B, C e E encontravam-se em boas condições de higiene, de acordo com recomendações brasileiras (Figura 27). As dos restaurantes D, F e G apresentaram contagens tão altas quanto  $2 \log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$  para os três microrganismos investigados e estavam em condições insatisfatórias de higiene.

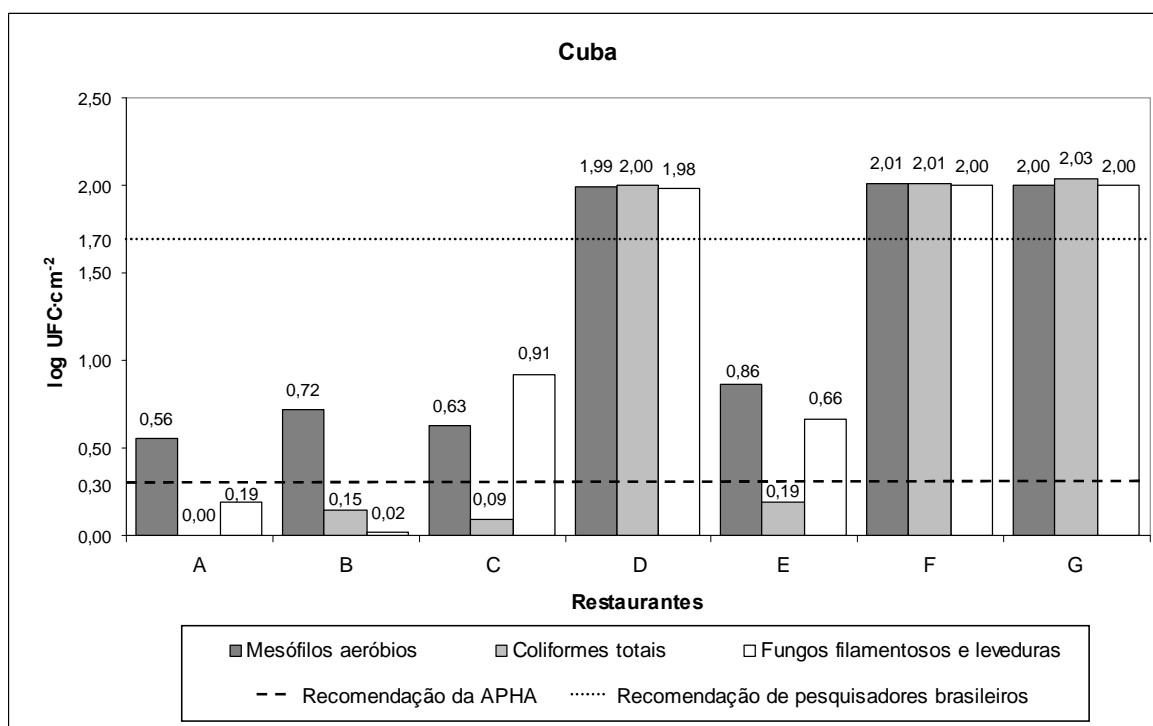


Figura 27 - Avaliação das condições higiênicas das superfícies de cubas utilizadas no preparo de saladas em restaurantes comerciais de Viçosa, MG.

Os estabelecimentos que participaram dessa pesquisa possuíam alvará para funcionamento. Porém, quando consultados, não apresentaram o manual de boas práticas, regulamentação recente na época de realização dessa pesquisa, a RDC 216 (BRASIL, 2004). Foram observadas, em três restaurantes, pastas contendo formulários e recomendações. Porém, os dados não estavam preenchidos e os proprietários mostravam-se inseguros no manuseio.

Observa-se, nesta pesquisa, que as condições de higiene dos restaurantes raramente atendem às recomendações. Os estabelecimentos operam em desacordo com a legislação brasileira vigente. De modo geral, não há conscientização de que clientes podem estar expostos a perigos microbiológicos. Portanto, os manipuladores de

alimentos dos restaurantes, assim como os proprietários, precisam de treinamentos a fim de reconhecer que suas atitudes são de importância fundamental para a sanidade dos alimentos preparados e distribuídos e que elas estão implicadas na promoção à saúde das pessoas que fazem suas refeições nos restaurantes.

#### 4.4. Avaliação da microbiota da alface

##### 4.4.1. Análise da microbiota da alface

As amostras de alface avaliadas apresentaram microbiota diversificada, provavelmente em virtude das condições ambientais de cultivo no campo e outras contaminações que ocorrem durante transporte e manuseio e preparo nos restaurantes (Tabela 3).

Tabela 3 – Logarítmo das contagens dos microrganismos das amostras de alface Vitória de Santo Antão coletadas no campo, no momento da entrega nos restaurantes e após o preparo para consumo.

Microrganismos	Etapa	Incidência	Produtor 1 e Restaurante A	Produtor 2 e Restaurante B	Produtor 3 e Restaurante C
			Log UFC.g <sup>-1</sup> $\bar{x}$	Log UFC.g <sup>-1</sup> $\bar{x}$	Log UFC.g <sup>-1</sup> $\bar{x}$
Coliformes a 45 °C	Campo	9 (33,3%)	5,3	4,6	3,9
	Entrega	9 (33,3%)	4,6	3,9	4,3
	Restaurante	9 (33,3%)	3,8	3,6	3,6
Reduções decimais			0,8	0,3	0,7
Enterobactérias	Campo	9 (33,3%)	5,4	5,4	5,5
	Entrega	9 (33,3%)	4,7	4,7	5,2
	Restaurante	9 (33,3%)	4,1	3,4	3,8
Reduções decimais			0,6	1,3	1,4
Mesófilos aeróbios	Campo	9 (33,3%)	6,8	7,1	6,8
	Entrega	9 (33,3%)	6,8	6,7	7,4
	Restaurante	9 (33,3%)	6,1	5,1	5,0
Reduções decimais			0,7	1,6	2,4
Fungos filamentosos e leveduras	Campo	9 (33,3%)	4,8	5,7	5,0
	Entrega	9 (33,3%)	4,5	4,4	4,3
	Restaurante	9 (33,3%)	4,7	3,1	4,4
Reduções decimais			>0,2	1,3	>0,1

Quanto aos coliformes, é interessante ressaltar que, entre as etapas campo e entrega para os restaurantes A e B, as contagens foram reduzidas em  $0,7 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , e aumentou em  $0,4 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  para o restaurante C. Novamente, o processo de lavagem pode estar envolvido. A água removeu mecanicamente os microrganismos, fato constatado pela diminuição da contagem microbiana. Porém, o uso de água reciclada pelo fornecedor C pode ter contribuído para o aumento de contagens de coliformes.

A eficiência do processo de sanitização realizada nos restaurantes pode ser analisada pelos resultados. Entre as etapas, entrega e final de preparação as reduções decimais observadas foram, nos restaurantes A, B e C de  $0,8 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $0,3 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  e  $0,7 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Reduções decimais tão baixas nas contagens microbianas sugerem que a sanitização está sendo realizada de maneira inadequada. Em relação às contagens de enterobactérias, constatou-se a redução média de  $0,56 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  entre a colheita e entrega para os três restaurantes. A redução média desse grupo microbiano pelos processos de sanitização com ácido acético dos três restaurantes foi de  $1,10 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ .

De acordo com as diretrizes para segurança alimentar de países da Europa, por exemplo, *German Official Criteria for Prepared Salad Vegetables* (LUND, 1993) e da *French Microbiological Specifications* para salada preparada de hortaliças (NGUYEN-THE; CARLIN, 1994), o grupo enterobactérias não é critério para rejeição de frutas e hortaliças frescas e saladas. Entretanto, o *European Scientific Committee* informou que muitos dos surtos ocorridos estavam associados com microrganismos membros da família *Enterobacteriaceae* (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Little et al. (1999) informaram que o grau de contaminação de enterobactérias na alface fresca investigadas por eles era superior a  $5 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . Nguz et al. (2005) investigaram, também, a contaminação por enterobactérias em hortaliças orgânicas cortadas frescas prontas para consumo. Os resultados revelaram que a incidência de enterobactérias era de 73% nas amostras e a média da contaminação era de  $3,7 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , com variações entre  $1,6$  e  $6,9 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ .

As contagens totais de mesófilos aeróbios não apresentaram reduções entre as etapas de colheita e entrega para o restaurante A. Houve redução desses microrganismos em  $0,4 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  para o restaurante e, novamente, a contagem aumentou em  $0,6 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  para o restaurante C.

Vários fatores contribuem para a alta contagem de mesófilos aeróbios. Além do método de lavagem realizado pelo produtor rural, outro problema é o manuseio e o modo de transporte. Observou-se que, após a lavagem, a alface é manipulada e entra em contato com caixas plásticas. Depois, sem qualquer proteção é transportada da propriedade rural em carrocerias, por estradas não pavimentadas. Restam, portanto, os

procedimentos de limpeza e sanitização realizados no restaurante durante preparo para o consumo. A redução foi de 0,7 log UFC·g<sup>-1</sup>, 1,6 log UFC·g<sup>-1</sup> e 2,4 log UFC·g<sup>-1</sup> nos restaurantes A, B e C, respectivamente, entre as etapas entrega e final de processamento. A remoção de folhas externas mais sujas e com lesões, além de sujidades aparentes, pode ter auxiliado nessas reduções relevantes que ocorreram nos restaurantes B e C.

A alface pronta para consumo apresentou contagens médias de mesófilos aeróbios de 6,1 log UFC·g<sup>-1</sup>, 5,1 log UFC·g<sup>-1</sup> e 5,0 log UFC·g<sup>-1</sup> nos restaurantes A, B e C, respectivamente. No Brasil, as contagens totais de microrganismos mesófilos aeróbios em hortaliças frescas não constituem critério de rejeição. No Japão, por exemplo, embora não tenha nenhum padrão legal para a contaminação microbiana máxima aceitável para hortaliças cortadas frescas, a especificação industrial estabelecida para a contagem total de mesófilos aeróbios é < 5 log UFC·g<sup>-1</sup>. Contagens acima desse valor é, para as indústrias japonesas, critério de rejeição. A condição considerada ótima e de acordo com boas práticas de fabricação são contagens < 3 log UFC·g<sup>-1</sup> de mesófilos aeróbios após o processamento. O argumento das indústrias japonesas para tal rigor é o conhecimento de informações que relacionam o número de populações microbianas e a probabilidade de infecção (KOSEKI; ITOH, 2001).

Rose e Gerba (1991) informaram que a probabilidade de infecção por *Salmonella* é de 50% quando 1 x 10<sup>3</sup> células são ingeridas. Buchanan e Whiting (1996) informaram que a probabilidade de infecção por *Shigella flexneri* era superior a 50% quando 1 x 10<sup>5</sup> células são ingeridas. Anderson et al. (1995) informaram que *Bacillus cereus* pode causar doença de origem alimentar com uma dose infectiva tão baixa quanto 1 x 10<sup>4</sup> células. Portanto, o número de patógenos ingeridos necessários para causar sintomas clínicos em humanos varia de acordo com a espécie bacteriana (D'AOUST, 1985). Rose e Gerba (1991) informaram que se o número total de células do microrganismo ingerido for menor que 1 x 10<sup>3</sup> células, o risco de infecção é relativamente baixo.

Apesar de ocorrer alguma redução nas populações de fungos filamentosos e leveduras entre as etapas “campo” e “entrega” isso não ocorreu entre as etapas da entrega e final do processamento. Inclusive, houve pequenos aumentos nas contagens desse grupo microbiano na alface “pronta para consumo” dos restaurantes A e C.

As contagens de fungos e leveduras em hortaliças frescas não constituem critério de rejeição. Contudo, alguns fungos podem produzir micotoxinas. Além disso, cerca de dois terços da deterioração em frutas e hortaliças são causados por fungos (ICMSF, 1998). Espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Rhizopus* estão envolvidos. A deterioração está associada à atividade celulolítica ou pectinolítica, que causa amolecimento e enfraquecimento das estruturas da planta. Essas estruturas

são importantes barreiras para prevenir a adesão e o crescimento de microrganismos contaminantes (EUROPEAN COMISSION, 2002).

Isto é de importância no caso de tempo maior de vida de prateleira no varejo. No restaurante, não há intenção de armazenamento muito longo. Podem ocorrer sobras de alface preparada nos restaurantes, mas, nesse caso, o consumo ocorre em 24 h após o preparo.

Nos três restaurantes investigados, os proprietários informaram que adquirem e instruem seus colaboradores para utilizarem cloraminas orgânicas na sanitização de hortaliças servidas cruas. Porém, observou-se durante essa pesquisa que o procedimento não é realizado de maneira correta. Em um dos restaurantes, o colaborador recebeu as alfaces do produtor, preparou a solução clorada e imergiu todas as unidades, sem desfolhar e sem lavar. O tempo de contato foi de 1 h e 42 min. Este tempo coincidiu com o tempo que a alface permanece em espera para o início da preparação das saladas cruas. Constatou-se também que, na ausência do sanitizante clorado para a desinfecção das hortaliças, é usado ovinagre. Essas observações serviram de base para estudos posteriores dessa pesquisa.

Observou-se que a temperatura da alface pronta para consumo era idêntica à da água utilizada para os processos de lavagem e sanitização. As temperaturas mínimas e máximas observadas no momento da entrega e na alface pronta para consumo estão apresentadas na Tabela 4. Durante o período de distribuição, somente as folhas que permanecem na parte de baixo das cubas, próximas ao sistema de refrigeração, apresentaram temperatura mais baixa. O tempo observado entre final de processamento até o final de distribuição foi de 4 horas.

Tabela 4 - Temperaturas mínimas e máximas registradas no processamento da alface no período de maio a agosto de 2006

Etapa	Restaurante A	Restaurante B	Restaurante C
	T °C	T °C	T °C
Entrega	10,9 - 19,2	11,8 - 17,8	18,8 - 20,3
Pronta para consumo	17,8 - 21,7	19,2 - 21,9	20,9 - 22,3

#### 4.4.2. Identificação das enterobactérias isoladas da alface

Dentre as 27 amostras de alface analisadas em cada uma das etapas da cadeia do campo à mesa, 18 microrganismos isolados foram identificados pelo sistema API 20E para identificação de enterobactérias e outros bacilos Gram-negativos não fastidiosos. Os gêneros identificados nesta pesquisa incluíram *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Cronobacter*,

*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Raoultella* e *Serratia*. Dentre as bactérias do gênero *Enterobacter*, a bactéria originalmente identificada como *Enterobacter sakazakii* foi reclassificada em um novo gênero denominado *Cronobacter* (IVERSEN et al., 2008). Nessa pesquisa, a bactéria foi renomeada para *Cronobacter sakazakii*. Os gêneros e as espécies identificados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Gêneros e espécies de bactérias Gram-negativas identificadas pelo sistema API20E

Gênero e espécie	O N P G	A D H	L D C	O D C	C I T	H <sub>2</sub> S	U R E	T D A	I N D	V P	G E L	G L U	M A N	I N O	S O R	R H A	S A C	M E L	A M Y	A R A	O X I	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Cronobacter cloacae</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Escherichia coli 1</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea ssp 3</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas luteola</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>Pseudomonas oryzae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Rahnella aquatilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Raoultella terrigena</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Serratia odorifera</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Serratia rubideae</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-

ONPG 2-nitrofenil-βD-galactopiranosida; ADH arginina dihidrolase; LDC lisina descarboxilase; ODC ornitina descarboxilase; CIT citrato de sódio, H<sub>2</sub>S produção de ácido sulfídrico; URE ureia; TDA L-Triptofano (triptofano desaminase); IND L-triptofano (produção de indol); VP Piruvato de sódio; GEL Gelatina bovina; GLU D- glucose, MAN D-manitol; INO Inositol; SOR D-sorbitol; RHA L-ramnose; SAC D-sacarose; MEL D-melibiose; AMY Amigdalina; ARA L-arabinose; OX teste da oxidase.

A distribuição dos tipos de isolados nas três etapas da cadeia de produção da alface indicou que *Serratia rubideae*, *Pseudomonas luteolla*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pantoea* e *Enterobacter cloacae* foram espécies mais frequentemente isoladas nas amostras coletadas no campo e nas que foram entregues aos restaurantes (Tabela 6). A frequência deles variou entre 92,6% e 25,9% nessas etapas. Na alface pronta para consumo na etapa restaurante, as enterobactérias *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* e *Serratia rubidae* estavam presentes em 81,5% das amostras, *Pantoea* sp e *Pseudomonas luteolla* em 55,6% e *Pseudomonas oryzihabitans* em 33,3%. As outras bactérias estiveram presentes em quantidades menores nas diferentes etapas, contudo não foram detectadas nas amostras da alface pronta para consumo. Estas bactérias foram identificadas como *Citrobacter freundii*, *Cronobacter gergoviae*, *Raoultella ornithinolytica*.

Os microrganismos foram listados e a prevalência em cada uma das três etapas da cadeia produtiva, expressada em porcentagem, está apresentada na Tabela 6.



Tabela 6 - Prevalência das enterobactérias nas três etapas da cadeia de produção da alface Vitória de Santo Antão.

Microrganismo	Produtor 1 e restaurante A			Produtor 2 e restaurante B			Produtor 3 e restaurante C			Total		
	Campo (n=9)	Entrega (n=9)	Rest. (n=9)	Campo (n=9)	Entrega (n=9)	Rest. (n=9)	Campo (n=9)	Entrega (n=9)	Rest. (n=9)	Campo (n=27)	Entrega (n=27)	Rest. (n=27)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 (22,2%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	6 (22,2%)	7 (25,9%)	7 (25,9%)
<i>Citrobacter freundii</i>	nd	nd	nd	1 (11,1%)	2 (22,2%)	nd	nd	nd	nd	1 (3,7%)	2 (7,4%)	nd
<i>Enterobacter cloacae</i>	6 (66,7%)	6 (66,7%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	nd	nd	nd	9 (33,3%)	7 (25,9%)	4 (14,8%)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	nd	nd	nd	nd	2 (22,2%)	nd	nd	nd	nd	nd	2 (7,4%)	nd
<i>Cronobacter sakazakii</i>	2 (22,2%)	1 (11,1%)	nd	nd	5 (55,6%)	3 (33,3%)	nd	2 (22,2%)	nd	2 (7,4%)	8 (29,6%)	3 (11,1%)
<i>Escherichia coli</i>	nd	2 (22,2%)	nd	nd	nd	1 (11,1%)	1 (11,1%)	nd	nd	nd	2 (7,4%)	1 (3,7%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (11,1%)	3 (33,3%)	7 (77,8%)	nd	2 (22,2%)	9 (100%)	nd	nd	6 (66,7%)	1 (3,7%)	5 (18,5%)	22 (81,5%)
<i>Morganella morganii</i>	2 (22,2%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	nd	1 (11,1%)	1 (11,1%)	nd	1 (11,1%)	nd	2 (7,4%)	3 (11,1%)	3 (11,1%)
<i>Pantoea</i>	1 (11,1%)	5 (55,6%)	4 (44,4%)	6 (66,7%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)	9 (100%)	4 (44,4%)	6 (66,7%)	16 (59,3%)	13 (48,1%)	15 (55,6%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3 (33,3%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	3 (11,1%)	2 (7,4%)	2 (7,4%)
<i>Pseudomonas luteolla</i>	8 (88,9%)	5 (55,6%)	7 (77,8%)	7 (77,8%)	9 (100%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)	9 (100%)	4 (44,4%)	20 (74,1%)	23 (85,2%)	15 (55,6%)
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	8 (88,9%)	4 (44,4%)	2 (22,2%)	4 (44,4%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)	5 (55,6%)	7 (77,8%)	4 (44,4%)	17 (63,0%)	14 (51,9%)	9 (33,3%)
<i>Rahnella aquatilis</i>	nd	1 (11,1%)	3 (33,3%)	nd	1 (11,1%)	nd	nd	nd	nd	nd	2 (7,4%)	3 (11,1%)
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1 (11,1%)	nd	nd	1 (3,7%)	nd	nd
<i>Raoultella terrigena</i>	2 (22,2%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2 (7,4%)	1 (3,7%)	2 (7,4%)
<i>Serratia marcescens</i>	nd	nd	nd	nd	nd	1 (11,1%)	nd	nd	nd	nd	nd	1 (3,7%)
<i>Serratia odorifera</i>	nd	nd	nd	nd	nd	1 (11,1%)	nd	nd	nd	nd	nd	1 (3,7%)
<i>Serratia rubidaea</i>	7 (77,8%)	5 (55,6%)	5 (55,6%)	9 (100%)	7 (77,8%)	9 (100%)	9 (100%)	8 (88,9%)	8 (88,9%)	25 (92,6%)	20 (74,1%)	22 (81,5%)

nd = não detectado.

#### 4.4.3. Identificação de microrganismos potencialmente perigosos em alfaces servidas nos restaurantes comerciais de Viçosa, MG

Foi compilada uma lista com os microrganismos que causaram doenças de origem alimentar de etiologia conhecida, informados pelos programas de vigilância da Organização Mundial da Saúde da Europa, Canadá, Holanda e outros pela literatura científica atual. Dentre os microrganismos listados incluíram-se bactérias da Família *Enterobacteriaceae*. Um resumo da lista está apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Enterobactérias que causaram doenças de origem alimentar de etiologia conhecida informadas na literatura

Enterobactéria	Referências
<i>Aeromonas spp</i>	F
<i>Escherichia coli</i>	A, B e C
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	E
<i>Enterobacter cloacae</i>	B
<i>Enterobacter sakazakii</i>	D
<i>Klebsiella spp.</i>	C
<i>Proteus penneri</i>	C
<i>Providencia spp</i>	F
<i>Salmonella spp.</i>	A, B e C
<i>Shigella spp.</i>	A, B e C
<i>Vibrio spp</i>	C
<i>Yersinia enterocolitica</i>	A, B e C
A) NOTERMANS; VAN DER GIESSEN (1993), da Holanda; B) TODD (1991), do Canadá; C) FAO (1991), da Europa; D) BEUCHAT et al. (2009); E) MEAD; GRIFFIN (1998); F) BRYAN (1979).	

Ao realizar a primeira fase da análise de perigos, dois microrganismos, *E. coli*, *C. sakazakii*, foram considerados potencialmente perigosos. Informações da literatura justificaram a escolha. *Escherichia coli* é causa de doenças diarreicas nos países em desenvolvimento (MERREL; CAMILI, 2002). Essa bactéria é conceituada como microrganismo indicador, direto ou indireto, de contaminação de origem fecal mais válido para alimentos consumidos crus. Entretanto, isso não quer dizer que *E. coli* seja um bom indicador de contaminação fecal de alimentos processados. Dados indicam que *E. coli* pode crescer em uma variedade de nichos extra intestinais, inclusive em ambientes de processamento de alimentos. A presença de *E. coli* ou de bactérias do grupo coliforme

em alimentos pasteurizados ou alimentos cozidos indicam contaminação pós-processamento (KORNACKI; JOHNSON, 2002). Em locais em que grande variedade de alimentos é processada há oportunidades de contaminação cruzada, por exemplo, com carnes ou com outros tipos de alimentos crus durante manipulação, corte e comercialização (IFT, 2001).

Outro perigo microbiológico identificado foi a bactéria *Cronobacter sakazakii*, que é um patógeno de origem alimentar, oportunista, associado com infecções em recém-nascidos (LAI, 2001; MULLANE et al., 2007). Porém, infecções em adultos também foram registradas (LAI, 2001; GOSNEY, 2008). Embora os surtos sejam raros, os recém-nascidos podem desenvolver sintomas severos como meningite, sépse, bacteremia e enterocolite necrotizante. Infecções neonatais foram associadas ao consumo de formulados infantis, que são produtos comercializados no mercado mundial (RICHARDS; GURLER; BEUCHAT, 2005). Por essa razão, muitos estudos científicos realizados até a presente data estão fornecendo dados para avaliação do risco em relação aos formulados infantis (FAO, 2006b).

Segundo Friedmann (2007), faltam informações sobre a ecologia de *C. sakazakii*. Esse microrganismo parece ser um constituinte relativamente comum ocorrendo em menor quantidade na microflora de vários alimentos e, também, em ambientes de processamento de alimentos (KANDHAL et al., 2004). Por exemplo, esta bactéria foi encontrada em alimentos prontos para consumo, como produtos de confeitarias. Neste caso, não foi identificado se o microrganismo resistiu ao processamento pelo calor ou se ocorreu contaminação pós-processamento. Contudo, a presença nesse tipo de alimento forneceu significante rota de contaminação nos ambientes doméstico e de alimentação coletiva, como serviços de alimentação e restaurantes. Os autores concluíram que a falta de informações sobre infecções em consumidores adultos saudáveis indica baixo impacto epidemiológico pela ingestão desses tipos de alimentos. Porém, o risco de infecção em pessoas imunocomprometidas e idosos permanece, ainda, desconhecido.

Quanto à resistência a sanitizantes, Kim, Ryu e Beuchat (2006) informaram que a eficácia de sanitizantes em inativar *C. sakazakii* de frutas e de hortaliças frescas não tem sido divulgada e que essas informações são críticas para o desenvolvimento de métodos para prevenção, controle ou eliminação desse microrganismo de alimentos frescos.

De acordo com a metodologia do APPCC, é preciso identificar se ocorre recontaminação após o processamento. Se tal contaminação ocorre, esse microrganismo deve ser incluído na lista de perigos. Nessa pesquisa, foi notória a incidência constante de *K. pneumoniae* nas amostras prontas para consumo avaliadas.

A bactéria *K. pneumoniae* é conhecida como um paradigma de patógeno oportunista, sendo as pessoas com sistema imunológico debilitado as mais acometidas.

As células das bactérias do gênero *Klebsiella* são circundadas por uma cápsula constituída de um polissacarídeo ácido complexo, essencial para sua virulência (ØSROV; ØSROV, 1984). Alguns isolados de *K. pneumoniae* encapsulados produzem colônias de aspecto mucóide e de consistência viscosa, de duas formas, lisa e rugosa. Dois tipos de adesinas fimbriais são predominantes em *Klebsiella*, fimbrias do tipo 1 e do tipo 3. Ambas são importantes fatores de adesão implicadas na patogenicidade dessa bactéria ao hospedeiro humano.

Estudos realizados por Cooke et al. (1980) sobre a distribuição da *Klebsiella* sp. em cozinha de hospital indicaram que 6 dentre 13 amostras de carnes cruas continham *Klebsiella*. Além disso, uma contaminação superior a  $3 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  foi observada em saladas de hortaliças cruas. Os autores encontraram, também, evidências da contaminação pela *Klebsiella* nas superfícies de contato com alimentos da cozinha.

Há registros da veiculação de *K. pneumoniae* por hortaliças e por outros alimentos de origem vegetal, inclusive com altas concentrações de açúcar e de ácido, como suco de laranja concentrado e congelado (FUENTES et al., 1985).

Stiles e Ng (1981), ao pesquisarem enterobactérias em diferentes estágios do sistema de produção de carnes, observaram que a enterobactéria mais frequentemente isolada e identificada era do gênero *Klebsiella*. O interessante é que esse microrganismo era a enterobactéria dominante nas carnes e nas superfícies de trabalho, principalmente nas fases de processamento e de embalagens das carnes cruas. Porém, era menos frequente nas carnes que se encontravam no varejo. Estudos realizados por Newton, Harrison e Smith (1977), e Cox et al. (1978) determinaram que 21,5% das *Enterobacteriaceae* encontradas no couro e nas carnes ainda nos abatedouros era *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados sugeriram que este microrganismo sobrevive por tempo curto e, portanto, a sua presença nas carnes do varejo indica que a contaminação foi recente. A interpretação é que houve más condições higiênicas e sanitárias durante manipulação. Ao final de seus trabalhos, os autores questionam se *Klebsiella pneumoniae* pode ser a enterobactéria mais significativa para ser utilizada como indicador de condições higiênicas e sanitárias das carnes, no varejo, do que *E. coli*.

*Klebsiella pneumoniae* foi implicada em infecções humanas como patógeno de origem alimentar enteroinvasivo e foi causa de infecção alimentar em uma pessoa sadia após o consumo de hambúrguer. A infecção foi grave e provocou a internação do indivíduo a uma unidade de terapia intensiva. O indivíduo teve septicemia que evoluiu causando colapso cardiovascular, falência respiratória, renal e hepática e coagulação intravascular disseminada. Apesar da severidade da doença, o indivíduo sobreviveu (SABOTA; HOPES; ZIEGLER, 1998).

Em seus estudos, Pereira (2001) observou a colonização dos intestinos e translocação da *Klebsiella pneumoniae* para o pulmão de camundongos que foram tratados com drogas imunodepressoras comumente utilizadas pela população, como a predinisona. Os resultados sugeriram que alimentos contaminados por *Klebsiella* podem representar riscos a imunodeprimidos, porque nessa condição este patógeno em potencial pode colonizar o intestino, alcançar outros órgãos e provocar infecções generalizadas. Bactérias do gênero *Klebsiella* são de importância no ambiente hospitalar porque ela é uma das principais responsáveis por infecções hospitalares (LI et al., 2008). Cassetari et al. (2006) informaram sobre um surto de infecções causado por *Klebsiella pneumoniae* resistente à antibióticos em um berçário de um hospital com surpreendente ação para mitigação. Após várias medidas de controle que somente diminuíram a ocorrência de novos casos a equipe apelou para a análise microbiológica das mãos dos profissionais, utilizando-se o teste do *swab*. A coleta foi dirigida a oito profissionais com lesões, predispostos à colonização por microrganismos não habituais. Desses, dois possuíam onicomicose e seis, descamações e fissuras. Um profissional teve o *swab* das mãos positivos para *Klebsiella pneumoniae* resistente à beta-lactamase e foi afastado e submetido a tratamento. Após o tratamento, o teste de *swab* apresentou negativo para *Klebsiella*. O controle continuou e o surto foi considerado controlado após um mês. A equipe considerou muito sugestivo de relação de causa e efeito o impacto imediato do tratamento do profissional na interrupção do surto, após o fracasso das demais medidas de controle.

#### **4.4.4. Análise quantitativa dos perigos microbianos potenciais na cadeia de produção da alface**

As contagens de *E.coli* foram superiores a  $3,0 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  nas amostras de alface coletadas no campo, dos três produtores rurais (Tabela 7). Porém, nas amostras das alfaces que foram entregues na manhã seguinte aos restaurantes, *E. coli* foi detectada. A média das contagens foi de  $4 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  nas amostras analisadas do restaurante A e nas do restaurante C, foi de  $3,0 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . As amostras da alface do restaurante B apresentaram contagens  $< 2 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Os resultados dessa pesquisa sugeriram que *E. coli* entrou na cadeia produtiva através da manipulação. No campo, além da água da lavagem, o método utilizado para essa primeira limpeza realizada pode ter sido a causa. Observou-se que várias unidades de alface são mergulhadas em água represada. Nesse caso, a mistura delas pode ter colaborado para disseminar a contaminação. Supostamente, bastaria uma unidade de alface contaminada para espalhar as bactérias na água de lavagem.

Tabela 7 - Incidência dos microrganismos potencialmente perigosos ao longo da cadeia de produção

Microrganismos	Etapa	Incidência	Produtor 1 e Restaurante A	Produtor 2 e Restaurante B	Produtor 3 e Restaurante C
			Média log UFC/g	Média log UFC/g	Média log UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Campo	nd	<3,0	<3,0	<3,0
	Entrega	2 (7,4%)	4,0	<2,0	3,0
	Restaurante	1 (3,7%)	<2,0	3,0	<2
Reduções decimais			>2,0	>1,0	>1,0
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Campo	2 (7,4%)	4,34	<3,0	<3,0
	Entrega	8 (29,6%)	3,0	3,34	3,90
	Restaurante	3(11,1)	<3,0	2,26	<3,0
Reduções decimais			3,0	1,08	>0,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Campo	1 (3,7%)	3,85	<3,0	<3,0
	Entrega	5 (18,5%)	4,1	3,54	<3,0
	Restaurante	22 (81,5%)	3,50	2,44	3,43
Reduções decimais			0,6	1,1	>0,43

Dentre as amostras analisadas da alface pronta para consumo, a média das contagens de *E. coli* no restaurante A e C foi  $< 2 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ . Como foi detectada na alface pronta para consumo do restaurante B, na ordem de  $3 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ , *E. coli*, ou não estava presente nas amostras analisadas, ou estava em nível mais baixo do que permitia a técnica utilizada na enumeração logo após a colheita e no momento da entrega ao restaurante. Portanto, este resultado sugeriu que a alface foi contaminada no restaurante. As causas prováveis foram contaminação cruzada com superfícies de utensílios, particularmente, facas, tábuas, e mãos mal higienizadas do manipulador.

A Resolução da Diretoria Colegiada, RDC 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece para hortaliças frescas “*in natura*”, preparadas e sanificadas a tolerância para a amostra indicativa de  $2 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  de coliformes a  $45^\circ\text{C}$  e ausência de *Salmonella* sp em 25 g (BRASIL, 2001).

Pelo menos uma amostra pronta para consumo encontrava-se em desacordo com o padrão microbiológico vigente. Jay (2000) informou que a dose infecciosa da bactéria *E. coli* do tipo enteroinvasiva em adultos saudáveis está entre  $6 \log \text{UFC}$  e  $8 \log \text{UFC}$  de células viáveis. Portanto, aparentemente, a amostra mencionada apresenta risco baixo de infecção.

Nesta pesquisa, *C. sakazakii* foi detectada na alface em duas amostras do campo (7,4%) do produtor rural 1, e as contagens médias nessas amostras foram de  $4,34 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . Nas amostras dos produtores 2 e 3, provavelmente estavam em quantidades abaixo do que permitiu a técnica utilizada. Porém, como ocorreu com *E. coli*, a água de lavagem pode ter disseminado a contaminação, porque nas alfaces entregues aos restaurantes, *C. sakazakii* foi detectada em oito amostras (29,6%). Nas amostras entregues ao restaurante A, as contagens foram, em média, de  $3,0 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . Nas amostras das alfaces entregues ao restaurante B e C, as contagens foram de 3,34 e  $3,90 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Nas amostras prontas para consumo dos restaurantes A e C, *C. sakazakii* não foi encontrada nas amostras analisadas ou estava presente em quantidade mais baixa do que permitia a técnica utilizada na enumeração. No restaurante B a bactéria estava presente em três amostras da alface pronta para consumo (11,1%), em quantidade média de  $2,26 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . Durante o processamento nos restaurantes, a remoção de folhas externas mais velhas e o tratamento com produtos clorados podem ter contribuído para a redução.

Baumgartner et al. (2009) informaram que *Cronobacter sakazakii* é um microrganismo comum em especiarias, plantas herbáceas e brotos comestíveis. Foi isolada da alface por Soriano et al. (2001), e de outras hortaliças por Leclercq, Wanegue e Baylac (2002).

A enterobactéria *Klebsiella pneumoniae* foi detectada na alface em todas as três etapas investigadas, apresentando frequência crescente. Nas amostras do campo foi detectada, nas amostras coletadas do produtor rural 1, incidência de 3,7%. Nas amostras que os produtores rurais entregaram aos restaurantes sua presença foi detectada em cinco amostras (18,5%) sendo duas entregues no restaurante A, e em três amostras entregues ao restaurante B. Porém, não foi encontrada nas amostras do restaurante C. A presença de *Klebsiella pneumoniae* foi confirmada em 22 amostras (81,5%) da alface pronta para consumo. Quantitativamente, as médias das contagens nas amostras do restaurante A foram de  $3,50 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , do restaurante B, de  $2,44 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  e, no restaurante C foi de  $3,43 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ .

A presença de *Klebsiella pneumoniae* nas diferentes etapas da cadeia produtiva da alface pode ser explicada por duas diferentes maneiras. Nas fases de cultivo, no campo, *K. pneumoniae* pode ter infectado a planta nos primeiros estágios do brotamento e sobrevivido simbioticamente no seu interior, exercendo a função de fixadora de nitrogênio. Esta afirmação está fundamentada nos estudos de Chelius e Triplett (2000). Esses autores informaram que uma linhagem de *K. pneumoniae*, denominada Kp342, é uma endófito fixadora de nitrogênio, originalmente isolada de milho. Os estudos de Dong et al. (2003) permitiram concluir que esta linhagem tem ampla variedade de hospedeiros

e é capaz de colonizar o interior de muitas plantas com uma quantidade menor que 10 células no inóculo (DONG et al., 2003).

Porém, bactérias do gênero *Klebsiella* são encontradas amplamente distribuídas na natureza, isoladas de solo, alimentos de origem vegetal e de água. São frequentes, mas, não exclusivas, habitantes do intestino de animais e humanos. Em humanos, pode ser encontrada em indivíduos saudáveis, numa proporção de 30 a 37%. Desses indivíduos portadores, 29 a 35% dos microrganismos do gênero *Klebsiella* isolados são de origem entérica e 3 ou 4% são da orofaringe (DAVIS; MATSEN, 1974).

Observa-se pelas informações que a alta incidência de *Klebsiella pneumoniae* na alface pronta para consumo ocorreu durante ou após o processamento. E a contaminação pode ter como causa as mãos contaminadas de manipuladores de alimentos.

#### **4.5. Testes-desafio a agentes antimicrobianos**

De acordo com a metodologia APPCC, dentre os microrganismos que permaneceram na lista é preciso saber qual deles é destruído durante o processamento. Para investigar a eficiência do processamento ou resistência dos microrganismos aos sanitizantes utilizados nos restaurantes foram realizados os testes de desafio microbiológico.

##### **4.5.1. Avaliação da concentração dos princípios ativos dos sanitizantes químicos utilizados nos restaurantes comerciais**

As análises titulométricas revelaram a concentração dos princípios ativos:

- a) A solução preparada a partir de dicloroisocianurato de sódio apresentou 170 mg·L<sup>-1</sup> de CRT, expressos em Cl<sub>2</sub>, pH de 6,13 a 25,7 °C.
- b) A solução de vinagre apresentou ácido acético na concentração de 0,16%, expressos em HAc, pH 3,06 a 25,3 °C.
- c) O vinagre escuro, da marca Toscano, usado nos restaurantes, apresentou ácido acético na concentração de 4,5%, expressos em HAc, pH 2,30 a 24,3 °C.

As soluções sanitizantes utilizadas nos restaurantes foram preparadas a partir de dicloroisocianurato de sódio, da marca Nippo-clor. Os colaboradores prepararam a solução conforme recomendação da embalagem do produto. A água foi medida com um recipiente graduado e a cloramina em pó medida em copo fornecido pelo fabricante. A solução de ácido acético foi preparada com vinagre escuro, da marca Toscano, o mesmo



utilizado nas preparações culinárias do restaurante. A água foi coletada em uma bacia e o vinagre adicionado, sem medida.

Os resultados das concentrações desses princípios ativos serviram de base para os estudos que se seguiram, como proposto pela metodologia de análises de perigos para os testes-desafio.

#### 4.5.2. Eficiência de soluções de ácido acético adicionado de cloreto de sódio sobre células planctônicas de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* avaliada pelo teste da suspensão

As soluções sanitizantes avaliadas não apresentaram diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) nas médias das reduções decimais (RD) de células planctônicas de *E. coli*. Em média, as soluções testadas reduziram a população inicial desse microrganismo em 0,60 ciclo log (Figura 28). No entanto, as médias das RD nas populações de células planctônicas de *C. sakazakii* e de *K. pneumoniae* indicaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), entre os mesmos tratamentos ( $p < 0,05$ ).

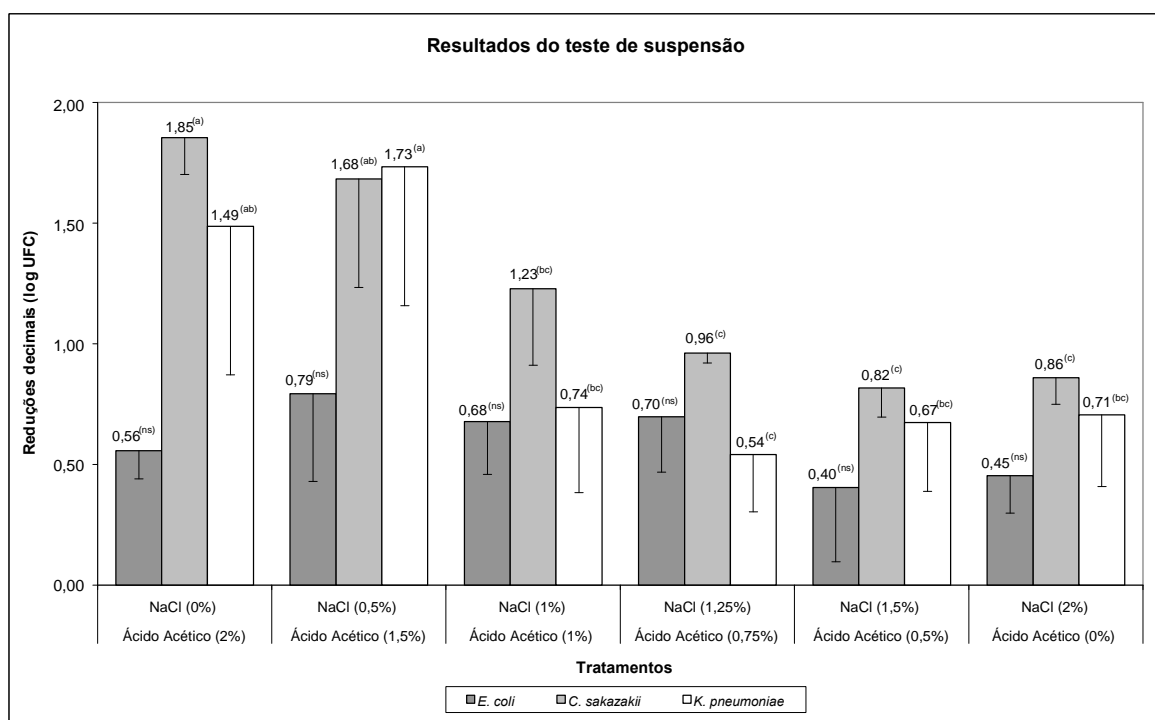


Figura 28 - Reduções decimais em populações de células planctônicas de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae*, após exposição a soluções de vinagre acrescentadas ou não de cloreto de sódio, realizadas pelo teste da suspensão. As barras representam os desvios-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

A solução de ácido acético 2% foi a que reduziu em 1,85 ciclos log, sobre *C. sakazakii*, sendo estatisticamente igual ao tratamento de ácido acético 1,5% e cloreto de sódio 0,5% sobre as células planctônicas de *K. pneumoniae*. As médias das reduções com os demais tratamentos foram diferentes e inferiores. Portanto, a solução contendo ácido acético 1,5% e cloreto de sódio 0,5% foi escolhida para o teste em que a inativação será realizada com os microrganismos aderidos à alface.

Porém, os sanitizantes à base de vinagre e de cloreto de sódio não foram aprovados pelo teste de suspensão, cujo objetivo é de reduzir a população inicial em 99,999%. Fatores inerentes à resistência fisiológica das próprias linhagens bacterianas testadas podem ter contribuído para a reprovação das soluções sanitizantes quanto à eficácia microbiana.

Tanto as linhagens patogênicas quanto as não patogênicas da bactéria *E. coli* têm capacidade inerente de sobreviver ao estresse ácido. As linhagens patogênicas são substancialmente mais resistentes a esse estresse do que a outros. Muitos microrganismos possuem uma resposta adaptativa que lhes confere a capacidade de sobreviver a ambientes extremamente ácidos. Este mecanismo denominado resposta de tolerância a ácidos está bem caracterizado para *E. coli*. Estudos demonstraram que a exposição a um pH que causa injúria subletal induz a expressão de numerosas proteínas do choque ácido que promove a sobrevivência bacteriana em subseqüentes ambientes extremamente ácidos. Tais sistemas de tolerância a ácidos estão presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e, atualmente, há aumentada evidência de que esta resposta ao estresse ácido é um importante componente da sobrevivência de patógenos bacterianos dentro do nicho que é o organismo do hospedeiro (MERREL; CAMILI, 2002).

Arnold et al. (2001) identificaram 26 genes induzidos após a exposição ao acetato. Dentre eles, estão muitos fatores regulados pelo regulon RpoS, incluindo *cfa*, que codifica uma ATP sintase  $F_0F_1$ . Ácidos graxos ciclopropanos são os principais componentes dos fosfolipídios de *E. coli* e um importante componente da resistência a ácido.

Outros componentes identificados incluíram uma porina de membrana denominada OmpC, que tem a função de proteção uma vez que regula a passagem de algumas moléculas através da membrana externa bacteriana, e Slp, uma lipoproteína de membrana que induz as células a entrarem na fase estacionária. Nesse estado, ocorrem importantes mudanças fisiológicas que permitem a célula sobreviver a uma variedade de estresses ambientais, como o osmótico e a radiação ultravioleta (ALEXANDER; ST. JOHN, 1994).

As informações da cinética de inativação de *C. Sakazakii* foram resultados dos experimentos de Edelson-Mammel, Porteous e Buchanan (2006). Os autores indicaram que a capacidade de *C. sakazakii* de tolerar condições ambientais ácidas é fortemente

dependente do pH. Das 12 linhagens testadas por eles, quase todas toleraram o desafio de sobreviver em caldo TSB acidificado por 5 h. Quando expostas ao pH 3,5, a redução no número de células viáveis foi de 0,5 log UFC·mL<sup>-1</sup> em 10 linhagens e 1,1 log UFC·mL<sup>-1</sup> e 3,5 log UFC·mL<sup>-1</sup> para outras duas linhagens. Porém, a exposição ao pH 3,0 produziu perda da viabilidade maior e mais rápida, e as 12 linhagens testadas apresentaram RD > 6 log UFC·mL<sup>-1</sup>. Dois tipos da cinética de inativação ficaram aparentes. As linhagens mais resistentes apresentaram redução logarítmica linear durante o período de exposição testado. Já as linhagens menos resistentes apresentaram inativação muito rápida na primeira 1 h de exposição, seguido de um lento declínio da população sobrevivente. Houve diferença na sobrevivência em pH 3,0 e pH 3,5 com diversidade de resistência ao pH ácido entre as linhagens. Concluíram que *C. sakazakii* pode ser classificada como uma *Enterobacteriaceae* moderadamente resistente a ácido.

Quando comparada a outros patógenos, *C. Sakazakii* é menos resistente a ácido que *Escherichia coli* enterohemorrágica, conforme informado por Buchanan e Edelson (1999), e que *Listeria monocytogenes*, também informado por Buchanan e Golden (1998). De acordo com Tetteh e Beuchat (2003a), a resistência de *C. Sakazakii* aos ácidos é similar à de *Shigella flexneri*, e é similar à resistência da *Salmonella* spp, informada por Gorden e Small (1993). Porém, é mais resistente que *Vibrio parahaemolyticus*, de acordo com as pesquisas de Wong e Wang (2004).

O mecanismo, ou vários deles, que confere resistência aos ácidos não foi ainda bem elucidado. Supostamente é o mesmo observado em outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* (EDELSON-MAMMEL; PORTEOUS; BUCHANAN, 2006).

Quanto à inativação de *K. pneumoniae*, os dados são escassos. Caetano (2003) observou que *K. pneumoniae* não cresceu em dietas com pH 3,9. Porém, o pesquisador não informou dados sobre reduções na população inicial inoculada na dieta enteral investigada.

#### **4.5.3. Avaliação da eficiência da água e de soluções sanitizantes em reduzir populações de células de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* aderidas à alface**

A ação antimicrobiana das soluções do composto clorado orgânico e do ácido acético a 1,5%, acrescentada de 0,5% de cloreto de sódio, apresentou diferenças ( $p < 0,05$ ) em comparação com a higienização somente com água (Figura 29). No entanto, não foi observada diferença entre a ação da água e da solução de ácido acético a 1,5%. Nenhuma solução sanitizante atingiu 3 RD na população microbiana, conforme recomendado para células sésseis (MOSTELER; BHISHOP, 1993).

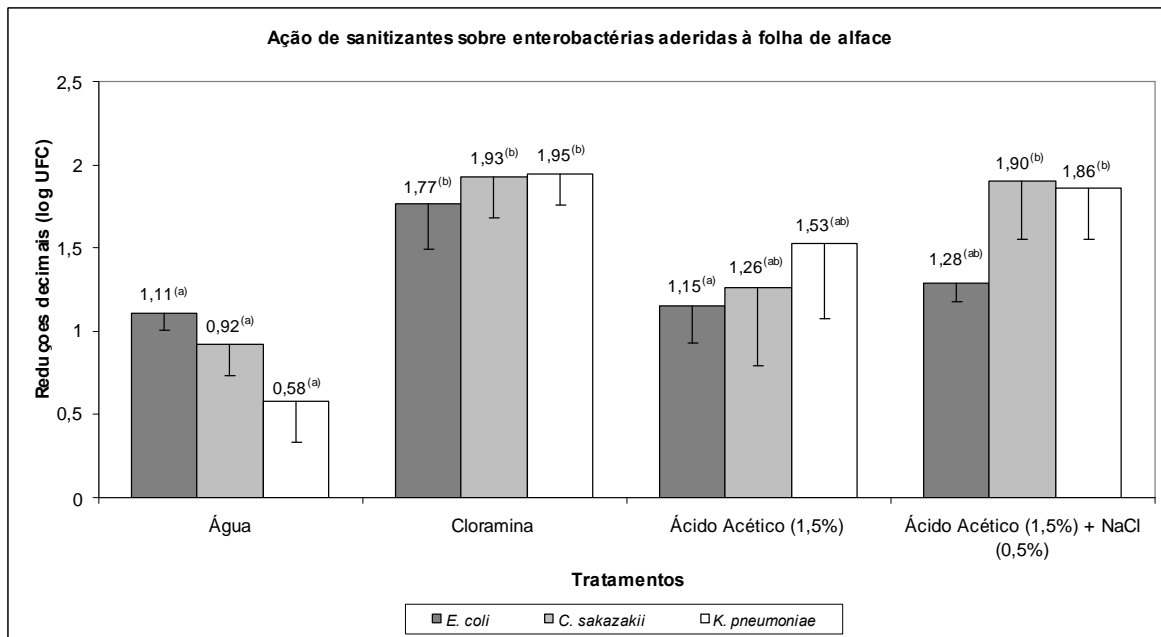


Figura 29 - Reduções decimais em populações de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* aderidas em folha de alface devido à ação da água e de sanitizantes químicos. As barras representam o desvio-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

Foi avaliada também a resistência entre bactérias *E. coli*, *C. sakazakii* e *K. pneumoniae* aderidas à folha de alface em relação aos mesmos tratamentos. A análise de variância das médias das reduções decimais proporcionados pelos tratamentos não identificou diferença ( $p \geq 0,05$ ) na resistência dos diferentes gêneros de bactérias em relação ao mesmo tratamento.

Concentrações de cloro residual mais elevada que a usada nesse experimento poderia ser uma alternativa para aumentar a ação antimicrobiana. No entanto, tratamentos com dosagens de cloro mais altas podem causar modificações nas qualidades sensoriais da alface, como alteração de cor, gosto e odor, limitando o uso para aplicações imediatamente antes do consumo. Hortaliças com tecidos delicados, por exemplo, a alface, não suportam tratamentos com concentrações de cloro residual elevadas. Além disso, as recomendações para uso seguro em frutas e hortaliças frescas são de 50 a 200 mg·L<sup>-1</sup> (FDA, 2001).

Deve-se ressaltar que a solução de ácido acético a 1,5% mostrou-se de baixa eficácia no controle dos microrganismos aderidos. Além disso, a adição de 0,5% de cloreto de sódio à solução de ácido 1,5% aumentou reduções decimais durante inativação, à semelhança de outras pesquisas. Tsujihata et al. (1998) informaram que soluções combinadas de ácido acético e cloreto de sódio tinham efeito sinérgico e eram capazes de inativar células planctônicas de *E. coli* O 157:H7, reconhecida por ser

extremamente resistente a ácidos orgânicos. Combinação semelhante à utilizada pelo autor foi testada e demonstrou ter ação sinérgica em inativar *C. sakazakii* e *K. pneumoniae*. No entanto, não foi eficaz contra *E. coli* do tipo 1. O fato de *E. coli* ser inerentemente mais resistente refletiu em menor redução decimal de sua população.

O cloreto de sódio, quando adicionado ao vinagre, sensibiliza as enterobactérias à ação dos ácidos orgânicos. Para homeostase interna, os níveis citoplasmáticos de íons  $\text{Na}^+$  precisam ser mantidos baixos ou o crescimento cessa. Os mecanismos de expulsão ativa, que operam sob essas condições, envolvem antiporters NhaA e NhaB, que exportam íons  $\text{Na}^+$  com o concomitante influxo de íons  $\text{H}^+$  e são dependentes da força próton motora, isto é, com gasto de energia. O poro NhaA é induzido pelos íons sódio e é regulado em nível transcricional pela proteína NhaR. Já o poro NhaB não é afetado pelos níveis de íons  $\text{Na}^+$ , e sua síntese não é regulada pela proteína NhaR. Desde que esses antiporters catalisem a entrada de  $\text{H}^+$  associado com efluxo de  $\text{Na}^+$ , é possível que a sensibilidade a ácido dos organismos expostos ao NaCl pode envolver mudanças no funcionamento dos antiporters (ROWBURY; GOODSON; HUMPREY, 1994).

A maioria dos tratamentos com ácido acético, considerados eficazes em reduzir populações de microrganismos aderidas em hortaliças, utilizou-o em concentrações altas. Por exemplo, a população de *Y. enterocolitica* inoculada em salsa foi reduzida em mais que 7 log UFC  $\text{g}^{-1}$  após o tratamento de 15 min em soluções de 2% de ácido acético (KARAPINAR; GONUL, 1992a). Também o tratamento de folhas de salsa inteiras por 5 minutos a 21 °C com vinagre 7,6% reduziu a população de *S. sonnei* mais que 6 log UFC  $\cdot \text{g}^{-1}$  (WU et al., 2000).

#### **4.6. Cinética de inativação de *Klebsiella pneumoniae* com soluções sanitizantes preparadas a partir de cloramina orgânica e de vinagre comercial**

##### **4.6.1. Cinética da inativação de *Klebsiella pneumoniae* pela cloramina orgânica com tempo de contato de até 64 minutos**

A curva de inativação apresentada na Figura 30 foi construída pelo ajuste do modelo de dois termos de Pruitt e Kamau (1993), com dados do número de sobreviventes da população de *K. pneumoniae* aderida à folha de alface a diferentes tempos de contato. Esses dados foram obtidos experimentalmente dos estudos da ação antimicrobiana de uma solução clorada preparada com uma cloramina orgânica (Nippo-clor) na concentração de 170  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  expressos em cloro residual total, pH 6,2 e usada a 22 °C. A Equação 63 expressa o modelo ajustado:

$$\ln(S) = \ln(0,9882 e^{-0,6862t} + 0,01182 e^{-0,0126t}) \quad (\text{Eq. 63})$$

Em que:

S é a fração total de sobreviventes ( $x/x_0$ ); e

t é o tempo de contato em min.

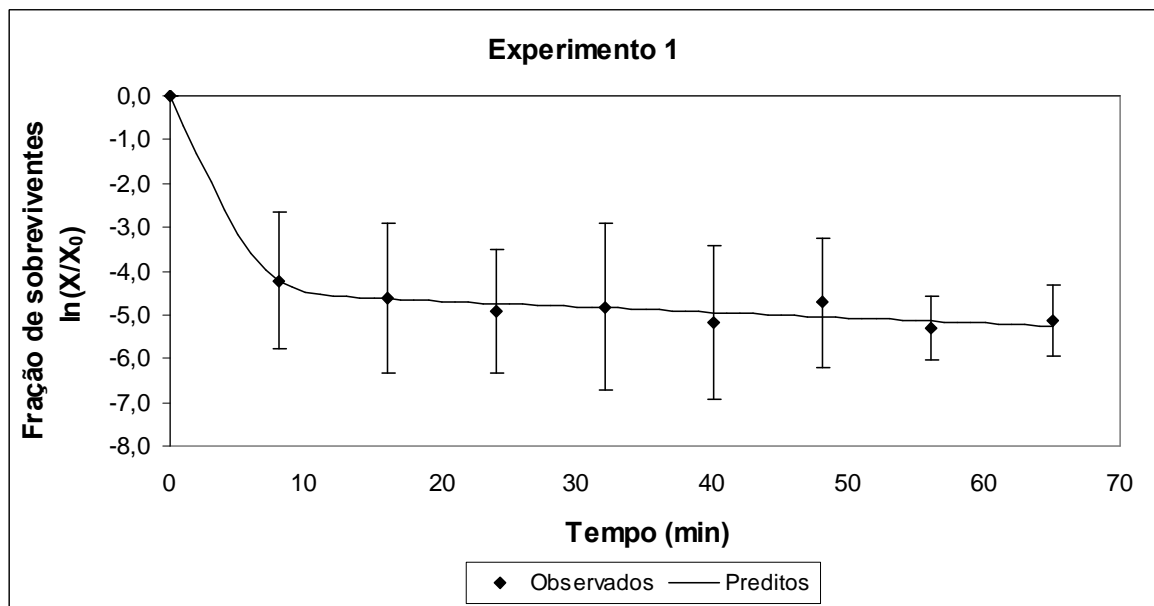


Figura 30 - Curva de sobrevivência de *Klebsiella pneumoniae* aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica ( $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRT, pH 6,2,  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os pontos plotados são os valores médios de quatro observações. As barras verticais representam os desvios-padrão da média. A linha é a curva predita baseada no ajuste dos dados com a Equação 51 usando-se regressão não linear.

Observa-se na Figura 30 que os resultados apresentaram a não linearidade da curva de inativação, sendo constatadas duas frações de sobreviventes, com suas cinéticas próprias, manifestando-se consecutivamente. A fração sensível apresentou rápido declínio a partir do ponto inicial, refletindo a morte rápida dessa subpopulação. A segunda característica foi ditada pela população mais resistente, manifestada pela formação da cauda.

Os valores de  $f$  e de  $b_1$  e  $b_2$  do modelo exponencial de dois termos para população mistas de células foram obtidos pela regressão não linear dos dados experimentais e estão apresentados na Tabela 8. A fração de microrganismos sensíveis ao princípio ativo ( $f$ ) foi estimada em 0,9882, o que indica que a maioria da população microbiana inicial (98,8%) de *K. pneumoniae* foi menos resistente. Esta fração mais sensível foi inativada a uma taxa específica de morte de  $0,6862 \text{ min}^{-1}$ . A fração resistente da população foi

inativada a uma taxa específica de morte de  $0,0126 \text{ min}^{-1}$ , ou seja, foi inativada a uma taxa muito menor que a da fração mais sensível.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica ( $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CRT, pH 6,2, 22 °C)

Parâmetros de sobrevivência	Valores
$f$ (fração sensível) $\pm s$	$0,9882 \pm 0,0027$
$b_1$ ( $\text{min}^{-1}$ ) $\pm s$	$0,6862 \pm 0,3683^a$
Valor D (min)	3,36
$b_2$ ( $\text{min}^{-1}$ ) $\pm s$	$0,0126 \pm 0,0088^b$
Valor D (min)	182,8

<sup>a</sup> relativos à fração sensível; <sup>b</sup> relativos à fração resistente

Observou-se experimentalmente que as duas subpopulações de células foram inativadas de maneira independente, a taxas diferentes, e não apresentaram nenhum tempo lag ou ombro na inativação. Por se tratarem de duas frações de sobreviventes com cinéticas lineares consecutivas, o valor D pôde ser calculado das porções lineares da curva de sobrevivência, usando-se a Equação 52.

Nesse experimento, o valor D predito para a subpopulação sensível foi 3,36 min. Para a subpopulação resistente, o valor D predito foi 182,8 min.

Uma vez que a população mais sensível corresponde a aproximadamente 99% da população inicial, são necessários 2 D para sua inativação. Com base nessa informação, o tempo predito para inativação da população sensível seria de 6,72 min. Dado que os pontos foram coletados com intervalos longos de tempo, de oito minutos entre eles, o número de pontos observados não foi suficiente para garantir que o ajuste realizado fosse conclusivo. Contudo, os resultados desse experimento mostraram que um tratamento com tempo de contato de 60 min não alcançou a redução de três ciclos logarítmicos na população de *K. pneumoniae* aderida à alface. Por exemplo, foi observado nesse ensaio que após 60 min de contato houve redução de 2,38 log UFC·g<sup>-1</sup> da população de *K. pneumoniae* aderida à alface. Para células sésseis, um agente químico é considerado eficaz quando reduz a contagem inicial de uma população em três ou mais ciclos logarítmicos (99,9%), em 30 segundos, a 20 °C (MOSTELLER; BISHOP, 1993).

Foi realizada a validação do modelo ajustado aos dados experimentais. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ), entre os valores dos dados observados e os preditos, foi usado para avaliar a predição alcançada pelo modelo. Nesse experimento, o modelo de dois termos ajustou-se aos dados experimentais com  $R^2$  de 0,71.

O valor do fator bias calculado foi 1,02 e indicou predições não tendenciosas, com valor próximo de 1. Porém, apresentou tendência leve de predição pelo lado não seguro, de 2%, em média.

O valor da raiz quadrada do quadrado médio do resíduo (RMSE) calculado foi em 0,99, ou seja, com desvio-padrão médio de 0,43 log UFC·g<sup>-1</sup> dos valores preditos. O fator exatidão calculado foi 1,21. Esses valores indicam grande desvio entre a predição realizada pelo modelo e os valores experimentais. Este fato pode ser constatado no gráfico da Figura 30, em que os dados observados apresentam grandes desvios-padrão da média. Portanto, a grande variabilidade que ocorre em sistemas biológicos, afeta as respostas estudadas (PEÑA, 2005). Uma vez que os desvios diminuem quando o tamanho da amostra aumenta, foi sugestivo para esse experimento que o aumento no número de unidades amostrais por ponto talvez pudesse diminuir esses desvios.

Na Tabela 9 são apresentados os valores dos principais índices estatísticos que avaliaram o desempenho e validaram o modelo.

Tabela 9 - Valores dos índices estatísticos para o modelo de dois termos aplicado às curvas de inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica (170 mg·L<sup>-1</sup> CRT, pH 6,2, 22 °C)

<b>Índices estatísticos</b>	<b>Valores</b>
R <sup>2</sup>	0,71
RMSE	0,99
BIAS	1,02
Exatidão	1,21

#### **4.6.2. Cinética da inativação de *Klebsiella pneumoniae* pela cloramina orgânica com tempo de contato até oito minutos**

O experimento 2 foi realizado para evidenciar a cinética de inativação da *Klebsiella pneumoniae* pela cloramina orgânica ocorrida nos primeiros minutos de contato, que não foi totalmente esclarecida pelo experimento 1. Nesse segundo experimento, os tempos de amostragem foram menores ao descrever o processo de inativação em sua fase inicial.

A Equação 64 apresenta os parâmetros ajustados para o modelo de dois termos de Pruitt e Kamau (1993) aos dados experimentais de inativação microbiana pelo tratamento com a solução clorada. Na Figura 31 é apresentado o gráfico da curva desse mesmo ajuste.



$$\ln(S) = \ln(0,9365e^{-3,8730t} - 0,0635e^{-0,0893t}) \quad (\text{Eq. 64})$$

Em que:

S é a fração total de sobreviventes ( $x/x_0$ ); e

t é o tempo de contato em min.

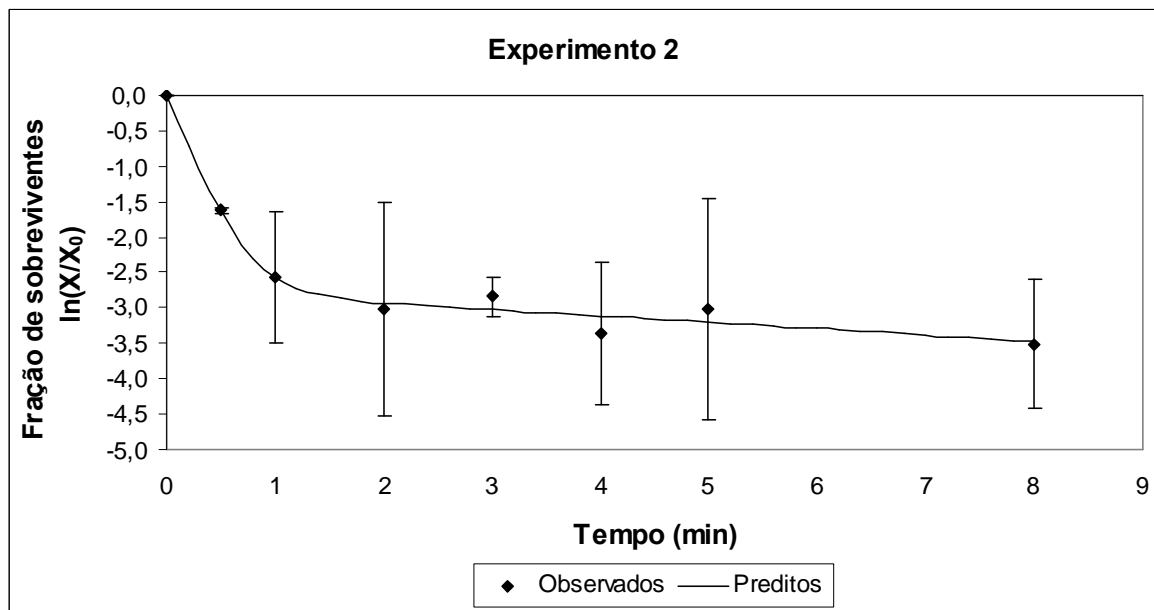


Figura 31 - Curva de inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida à folha de alface tratada com cloramina orgânica ( $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6,0, 22 °C). Os pontos plotados são valores médios de quatro observações. As barras verticais representam os desvios-padrão da média. A linha é a curva predita com base no ajuste dos dados com a Equação 51 usando-se regressão não linear.

A curva de sobreviventes apresentou não linearidade. À medida que o tempo de contato aumentou, houve manifestação de duas populações com cinéticas de destruição semilogarítmicas lineares e diferentes, sendo a primeira mais sensível e, a segunda, mais resistente.

Após trinta segundos de exposição ao tratamento com cloramina orgânica, a população inicial média, que era da ordem de  $5,76 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , foi reduzida em  $0,7 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ , o que representou a inativação de, aproximadamente, 80% dessa população. No tempo de ação de um minuto, cerca de 92,2% da população inicial foi inativada, representando uma redução de  $1,11 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . Até dois minutos houve inativação de 94,6%, redução de  $1,27 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Após a inativação da população sensível, o processo de inativação passa a ocorrer a taxas baixas e com pouca variação, apesar de tempo maior de contato,

formando uma cauda. Observou-se o prolongamento do tratamento até o tempo de contato de 8 min. Com este tempo de contato houve redução média de 1,51 log UFC·g<sup>-1</sup> da população inicial, ou seja, a população mais resistente, que era de 4,56 log UFC·g<sup>-1</sup>, após 8 min de tratamento, alcançou o valor final de 4,25 log UFC·g<sup>-1</sup>.

Os valores de  $f$  e de  $b_1$  e  $b_2$  do modelo exponencial de dois termos para população mista foram obtidos pela regressão não linear dos dados experimentais e estão apresentados na Tabela 10. Observou-se nessa população de resistência heterogênea a predominância da fração sensível apresentando valor  $f$  de 0,9365. A inativação da fração mais sensível ocorreu a uma taxa específica alta de 3,8730 min<sup>-1</sup>. Os sobreviventes da fração menos sensível foram inativados a uma taxa específica de morte bem mais baixa, ou seja, de 0,0893 min<sup>-1</sup>.

Observou-se, experimentalmente, que as duas subpopulações de células foram inativadas de maneira independente, a taxas diferentes de inativação, e não apresentaram tempo lag ou ombro durante a inativação. Por se tratarem de duas frações de sobreviventes com cinéticas lineares consecutivas, o valor D pôde ser calculado das porções lineares da curva de sobrevivência usando-se a Equação 52.

O experimento 2 evidenciou que o valor D predito para a subpopulação sensível foi de 0,59 min. E o valor D predito da subpopulação resistente, de 25,79 min.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica (170 mg·L<sup>-1</sup> CRT, pH 6,0, 22 °C)

<b>Parâmetros de sobrevivência</b>	<b>Valores</b>
$f$ (fração sensível) ± s	0,9365 ± 0,0104
$b_1$ (min <sup>-1</sup> ) ± s	3,8730 ± 1,3733 <sup>a</sup>
Valor D (min)	0,59
$b_2$ (min <sup>-1</sup> ) ± s	0,0893 ± 0,0622 <sup>b</sup>
Valor D (min)	25,79

<sup>a</sup> relativos à fração sensível; <sup>b</sup> relativos à fração resistente.

Os parâmetros estatísticos que validaram o modelo foram coeficiente de correlação ( $R^2$ ), raiz quadrada do quadrado médio do resíduo, fator bias e fator exatidão. Os valores calculados dos índices estatísticos estão apresentados na Tabela 11.

O modelo conseguiu explicar os dados experimentais do processo de inativação estudado com ajuste aos dados apresentando  $R^2$  de 0,70. A raiz quadrada do quadrado médio do resíduo (RMSE) calculado foi 0,70 e indicou um desvio-padrão médio de 0,3 log UFC·g<sup>-1</sup> para os valores preditos.

Tabela 11 - Valores dos índices estatísticos para o modelo de dois termos aplicado às curvas de inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida em folha de alface tratada com cloramina orgânica (170 mg·L<sup>-1</sup> CRT, pH 6,0, 22 °C)

<b>Índices estatísticos</b>	<b>Valores</b>
R <sup>2</sup>	0,70
RMSE	0,70
BIAS	1,03
Exatidão	1,21

O fator bias calculado apresentou valor de 1,03, indicando uma tendência de 3%, em média, de predição pelo lado não seguro. O fator exatidão calculado foi de 1,21 e indicou que o modelo realizou predições com desvios de 21% do valor experimental.

A redução da eficiência com o tempo de contato do sanitizante com o microrganismo foi observada em outros experimentos. Adams, Hartley e Cox (1989) notaram que o aumento do tempo de tratamento de 5 min para 30 min não resultou em maior número de reduções decimais nas populações dos microrganismos em folhas de alface tratadas com solução clorada de 100 mg·L<sup>-1</sup> a diferentes valores de pH, sendo um tratamento em pH 4,0 e outro a pH 5,0. A explicação pode estar relacionada a um fato óbvio: os microrganismos mais sensíveis da população são inativados mais rapidamente pela ação oxidante do ácido hipocloroso. Já a fração da população que apresenta maior resistência inerente ou devido a alguma forma de proteção demandaria maior tempo de contato para ser inativada (RYU; BEUCHAT, 2005).

Essa proteção pode estar associada com componentes lixiviados dos tecidos cortados ou com fendas, estômatos e pequenas fissuras que alojariam os microrganismos, além da natureza hidrofóbica das cutículas cerosas da superfície do vegetal. Essas conclusões estão de acordo com o encontrado na literatura. Beuchat (2000) sugeriu que a ineficiência de soluções cloradas em inativar bactérias patogênicas em alface pode ser devido à inacessibilidade do cloro às células alojadas em microambientes na superfície da hortaliça. Sugeriu também que a textura e a tendência hidrofóbica podem influenciar a eficiência do processo.

Adams, Hartley e Cox (1989) demonstraram que a eficácia antimicrobiana da solução de hipoclorito pode ser aumentada com a adição de um surfactante. Assim, Hassan e Frank (2003) informaram que hidrofobicidade é um fator chave no desempenho do surfactante na remoção de células da superfície de alface. O processo de desadesão de superfícies de hortaliças é difícil por causa dos vários mecanismos que devem ser superados e as forças das interações envolvidas. Além disso, o processo não pode danificar o tecido vegetal frágil. Janes et al. (1999) demonstraram que a solução de

NaCl/NaHCO<sub>3</sub>, pH 10, facilitou a remoção de células de *E. coli* O157:H7 da superfície de alface. Mas, Hassan e Frank (2003) informaram que o tratamento da alface com essa solução sanitizante aumentou a remoção das bactérias, mas o efeito à folha de alface não foi bom.

#### **4.6.3. Cinética da inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida à folha de alface pela com solução de vinagre contendo 0,18% de ácido acético**

O logaritmo natural dos números de sobreviventes da população de *K. pneumoniae* foi obtido experimentalmente dos estudos da ação antimicrobiana da solução de ácido acético 0,18% (v/v) e pH 2,8, na temperatura de 22 °C, preparada a partir de vinagre comercial. A Equação 65 apresenta as reduções da população *K. pneumoniae* ajustadas com o modelo exponencial de dois termos para população de resistência heterogênea proposta por Pruitt e Kamau (1993).

$$\ln(S) = \ln(0,7143 e^{-0,5610t} + 0,2857 e^{-0,0209t}) \quad (\text{Eq. 65})$$

Em que:

S é a fração total de sobreviventes ( $x/x_0$ ); e

t é o tempo de contato em min.

Na Figura 32 são apresentados os resultados do logaritmo natural da fração de sobreviventes contra o tempo de contato e mostra claramente a não linearidade da curva de sobreviventes. Pode ser observada a existência de duas frações de sobreviventes que diferiram na sensibilidade ao tratamento com ácido acético e, portanto, foram inativadas a taxas diferentes. A fração menos resistente apresentou um declínio rápido, refletindo a cinética de inativação da subpopulação mais sensível. A segunda característica foi ditada pela população menos resistente ao tratamento, com declínio lento, manifestado pela formação da cauda.

Nesse experimento, observou-se que a solução de vinagre, com baixa concentração de ácido acético, foi capaz de reduzir a população de *K. pneumoniae* aderida à alface. Contudo, a inativação ou remoção dos microrganismos ocorreu a taxas menores e mais lentamente que o tratamento com a cloramina orgânica. A população mais sensível foi reduzida após, aproximadamente, 2,5 min de contato em 0,37 ciclos logarítmicos. A população mais resistente foi inativada lentamente demonstrando que o tempo de contato foi importante para a inativação ou remoção. Ao final de 60 min a população inicial havia reduzido em 1,12 ciclos logarítmicos.

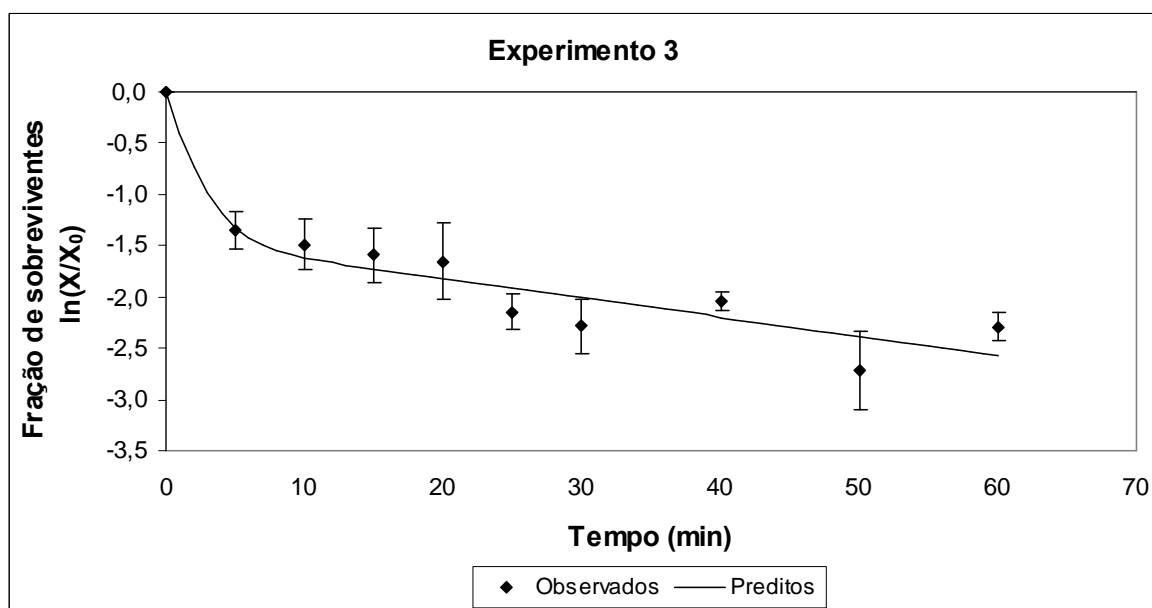


Figura 32 - Curvas de sobreviventes de *Klebsiella pneumoniae* aderida à folha de alface tratada com com ácido acético (0,18%, pH 2,8, 22 °C). Os pontos plotados são valores médios de quatro observações. As barras verticais representam o desvio-padrão da média. A linha representa a curva predita com base no ajuste dos dados pela Equação 51, usando-se regressão não linear.

Os valores de  $f$ , fornecidos pela análise de regressão com a equação de dois termos, assim como os valores de  $b_1$  e  $b_2$ , estão apresentados na Tabela 12.

O valor  $f$  foi de 0,7644 e significa que a fração sensível ao tratamento era representada por 76,4% da população. Nessa população de resitência heterogênea, notou-se a predominância da fração sensível ao ácido acético. A fração mais sensível ( $b_1$ ) foi inativada à taxa específica de  $0,5456 \text{ min}^{-1}$ . Determinou-se que a fração resistente da população ( $b_2$ ) foi inativada a uma taxa específica muito baixa, de  $0,0187 \text{ min}^{-1}$ . O valor D da população sensível foi calculado em 4,22 min e, da resistente, 124,6 min.

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos de inativação de *Klebsiella pneumoniae* aderida em folha de alface tratada com ácido acético (0,18% HAc, pH 2,8, 60 min)

Parâmetros de sobrevivência	Valores
$f$ (fração sensível) $\pm s$	0,7644 $\pm$ 0,0331
$b_1$ ( $\text{min}^{-1}$ ) $\pm s$	0,5456 $\pm$ 0,2895 <sup>a</sup>
Valor D (min)	4,22
$b_2$ ( $\text{min}^{-1}$ ) $\pm s$	0,0187 $\pm$ 0,0040 <sup>b</sup>
Valor D (min)	124,6

<sup>a</sup> relativo à fração sensível; <sup>b</sup> relativo à fração resistente.

O estudo da cinética de inativação demonstrou que a solução de ácido acético atuou sobre a *K. pneumoniae* lentamente, e que o tempo de contato fez diferença na redução decimal.

Comparando-se os resultados dos tratamentos com cloramina orgânica e solução de ácido acético, observa-se a eficiência desses. A cloramina orgânica, na concentração de 200 mg·L<sup>-1</sup>, reduziu a população inicial de 5,76 log UFC·g<sup>-1</sup> de *K. pneumoniae* aderida a alface para 4,25 log UFC·g<sup>-1</sup> em 8 min de contato. Este tratamento proporcionou redução de 1,51 ciclo logarítmico da população de *K. pneumoniae*. Portanto, a ação da cloramina é relativamente rápida. Já o tratamento usando-se a solução de ácido acético na concentração 0,18% exigiu o tempo de contato de 46 min para reduzir 1 ciclo logarítmico de *K. pneumoniae* aderida à alface. E, após o tempo de contato de 60 min, reduziu a população inicial de 6,39 log UFC·g<sup>-1</sup> para 5,27 log UFC·g<sup>-1</sup>, ou seja, 1,12 ciclo logarítmico.

O tempo gasto com processamento das hortaliças é fator econômico importante para a indústria e o comércio. Além disso, tempos de contato longos com agentes químicos causam danos aos tecidos vegetais. De modo geral, há alteração da cor da clorofila que, na presença de ácidos, torna-se parda.

Dentre os tratamentos, o que provocou reduções decimais maiores foi o da cloramina orgânica. Mas, ambos os tratamentos não podem ser considerados eficientes, uma vez que não reduziram a contagem inicial da população de *K. pneumoniae* em três ou mais ciclos logarítmicos (99,9%), em 30 segundos, a 20 °C, conforme recomendado para células sésseis (MOSTELER; BHISHOP, 1993).

Comparando-se os tratamentos de ácido acético e de cloramina orgânica conclui-se que a população sensível ao vinagre foi menor que a sensível à ação da cloramina orgânica. A população de *K. pneumoniae* sensível ao ácido acético em baixa concentração correspondeu a 76%. A população sensível à ação do ácido hipocloroso liberado pela cloramina orgânica foi bem maior, correspondendo a 94%.

Desses resultados, é possível concluir que esse sanitizante doméstico, usado na concentração de 0,18%, consideravelmente baixa, teve atividade bactericida contra *K. pneumoniae* aderida à folha de alface.

É comum no Brasil usar soluções de vinagre como tratamento sanitizante de hortaliças frescas, sendo considerado seguro e natural. O vinagre tem propriedades bacteriostática e bactericida. Entani et al. (1998) informaram que vinagre contendo 0,1% de ácido acético inibiu crescimento de *E. coli* O157:H7 em experimentos realizados *in vitro*.

Dependendo da concentração, o ácido acético pode ser bactericida. A ação antimicrobiana dos ácidos fracos como o acético é atribuída à sua fração não dissociada,

capaz de entrar na célula, diminuir o pH interno, resultando em morte da bactéria (KARAPINAR; GONUL, 1992b). Mas, os micorganismos apresentam sensibilidade diferente aos ácidos, sendo alguns mais tolerantes que outros. Por exemplo, *E. coli* pode ser mais tolerante ao vinagre. Estudos *in vitro* indicaram que para ser inativada com solução de ácido acético, preparada a partir de vinagre branco, foi preciso a concentração de 20% (VIJAYAKUMAR; WOLF-HALL, 2002). Nessa pesquisa, o vinagre comercial da marca Toscano apresentou ácido acético na concentração de 4%. Karapinar e Gonul (1992a) informaram que a ação de ácido acético sobre *Y. enterocolítica* dependia da quantidade de células e do tempo de exposição, além da concentração para ocorrer inativação. Concluíram que o sucesso no uso dos ácidos como sanitizantes depende do tipo de ácido, da sua concentração, do pH da solução, e, principalmente, da susceptibilidade do microrganismo considerado alvo do tratamento.

Estão apresentados, na Tabela 13, os resultados das análises dos parâmetros estatísticos que avaliaram o desempenho do modelo em descrever a cinética de inativação.

Tabela 13 - Valores dos índices estatísticos para o modelo de dois termos aplicado às curvas de inativação de *Klebsiella pneumoniae* com solução de ácido acético (0,18%, pH 2,8, 22 °C)

Índices estatísticos	Repetição 1
R <sup>2</sup>	0,87
RMSE	0,20
BIAS	1,01
Exatidão	1,09

O coeficiente de correlação do ajuste dos dados experimentais com o modelo exponencial de dois termos foi de 0,87, descrevendo bem a cinética do processo de inativação da bactéria *Klebsiella pneumoniae* pela solução de vinagre nas condições de uso, conforme observações realizadas durante as primeiras etapas desse trabalho.

Nesse experimento, o RMSE calculado foi 0,20, indicando desvio-padrão médio de 0,09 log UFC.g<sup>-1</sup> para os valores preditos. Esse é um valor baixo, o que indica que houve bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

O fator bias calculado foi 1,01, indicando que os valores preditos estão muito próximos dos observados, havendo pequena subestimação quanto aos valores observados. O valor do fator exatidão calculado foi 1,09 indicando que o modelo realizou as predições com desvios de até 9% do valor experimental.

## **4.7. Modelagem de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em folhas de alface**

### **4.7.1. Modelagem do crescimento com modelos primários**

Dados obtidos experimentalmente do crescimento de *K. pneumoniae* em alface sanitizada e armazenada nas temperaturas de 5 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C e 40 °C foram ajustados com a equação de Baranyi e Roberts (1994) e de Gompertz, usando-se o programa DMFit (Figura 33). O modelo de Baranyi ajustou melhor aos dados de crescimento de *K. pneumoniae* na alface que o modelo de Gompertz, pois este não foi capaz de determinar a duração da fase lag, taxa crescimento máximo e densidade populacional máxima, nas temperaturas testadas de 10 °C e de 20 °C. O problema desse modelo é que ele representa uma curva sigmoide e, portanto, não consegue representar linhas paralelas ao eixo x. Esta deficiência do modelo de Gompertz já foi informada na literatura. Baty e Delignette-Muller (2004) mostraram que o modelo de Baranyi e Roberts apresentou melhores ajustes que o modelo de Gompertz para definir a fase exponencial e de adaptação. A partir das curvas ajustadas, apresentadas na Figura 33 obtiveram-se os parâmetros cinéticos de crescimento, duração da fase lag ( $\lambda$ ), taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_{\max}$ ) e densidade populacional máxima (Tabela 14).

O modelo proposto por Baranyi; Roberts (1994) apresentou bom ajuste estatístico aos dados observados. As curvas obtidas com o DMFit mostraram coeficiente de correlação alto, com  $R^2$  maior que 0,95 para as temperaturas ensaiadas, exceto para a temperatura de 5°C.

A duração da fase lag de *K. pneumoniae* crescendo em alface armazenada à temperatura de 5 °C foi de 42,57 h, indicando que essa temperatura seria a ideal para as condições de armazenamento da alface por um tempo mais longo. Temperaturas de 5 °C nem sempre são fáceis de ser alcançadas em refrigeradores comerciais e domésticos, principalmente se estão superlotados. A essa temperatura, a alface apresentou aspecto fresco até o final do período ensaiado, mas com aparecimento de pigmento marrom nas bordas do corte a partir de 67 horas de armazenamento, indicando um possível escurecimento enzimático. Mas, a alface não apresentou sinais de deterioração.



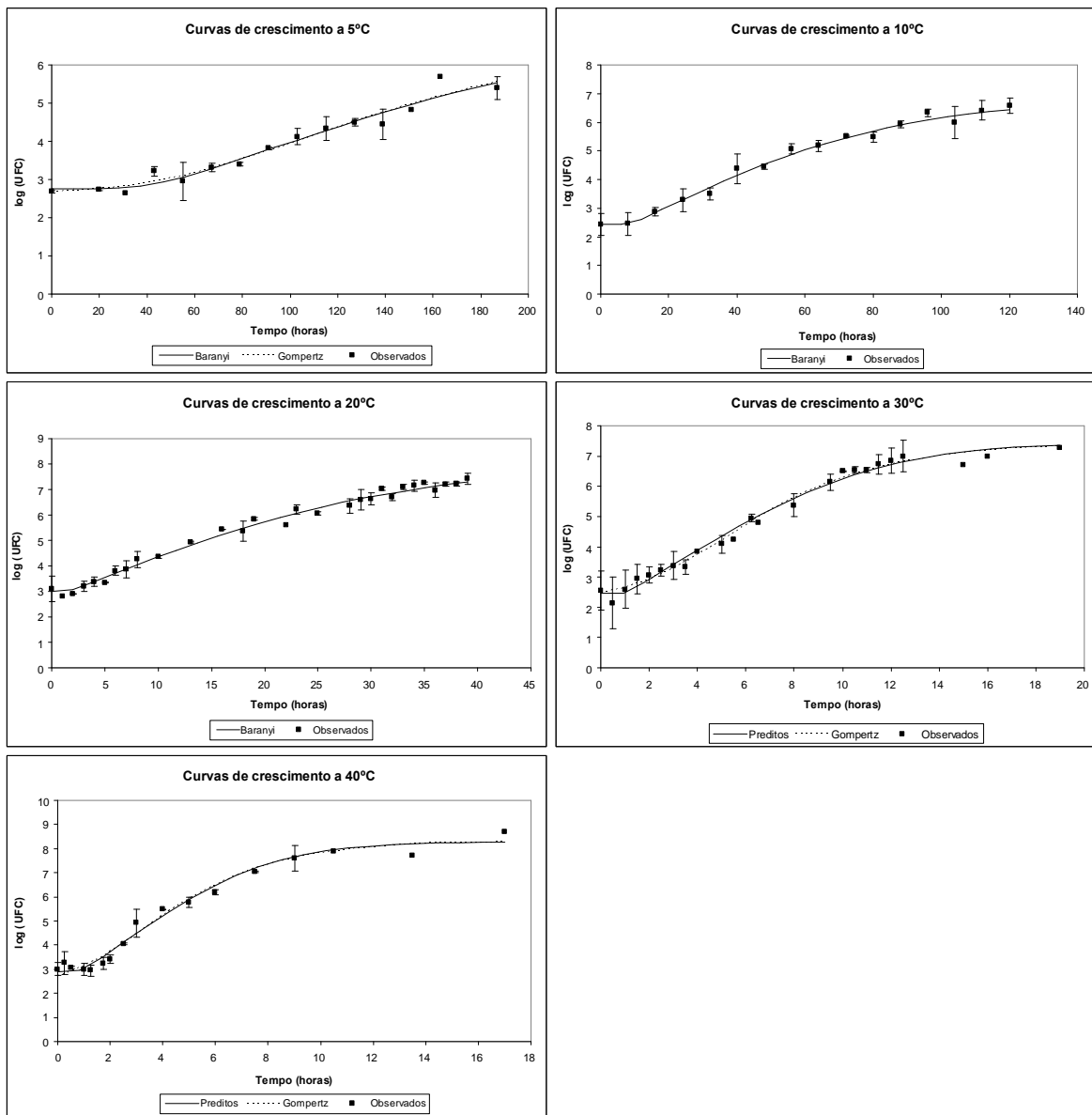


Figura 33 - Comportamento de *Klebsiella pneumoniae* na alface Vitória de Santo Antão armazenada nas temperaturas de 5 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C e 40 °C. As linhas contínuas representam o ajuste com o modelo de Baranyi e Roberts e, as pontilhadas, o ajuste com o modelo de Gompertz aos logaritmos das contagens, usando-se o DMFit. As populações informadas representam as médias das repetições dos ensaios, e as barras, apresentam o desvio-padrão da média.

Quando a temperatura de armazenamento foi elevada de 5 °C para 10 °C, ou seja, um aumento de apenas 5 °C, observou-se que a duração da fase lag decresceu de 42,57 h para 9,22 h. Temperaturas próximas de 10 °C são prevalentes nos restaurantes comerciais. Por exemplo, foi observado que a geladeira do restaurante A apresentava temperatura de 11,2 °C, a do B, temperatura de 9,3 °C, e a do C, temperatura de 13,2 °C.

Tabela 14 - Parâmetros cinéticos do crescimento de *Klebsiela penumonineae* na alface Vitória de Santo Antão obtidos pelo modelo de Baranyi e Roberts

Temp.	Parâmetros de crescimento					
	Modelo	População inicial $Y_0$	Tempo de adaptação $\lambda$ (h)	Taxa de crescimento $\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	Densidade populacional $Y_{end}$	Coefficiente de correlação $R^2$
5 °C	Baranyi	2,75	42,57	0,022	6,19	0,92
	Gompertz	2,64	39,10	0,021	6,63	0,92
10 °C	Baranyi	2,43	9,22	0,070	6,82	0,95
	Gompertz	-	-	-	-	-
20 °C	Baranyi	3,0	1,74	0,199	7,99	0,98
	Gompertz	-	-	-	-	-
30 °C	Baranyi	2,47	1,13	0,540	7,46	0,96
	Gompertz	2,39	1,34	0,503	7,45	0,96
40 °C	Baranyi	2,90	0,99	0,859	8,29	0,95
	Gompertz	2,45	0,36	0,764	8,35	0,95

Nas temperaturas ensaiadas de 20 °C, a fase lag durou 1,74 h, e a 30 °C, durou 1,13 h. Temperaturas próximas de 20 °C foram observadas na alface pronta para consumo durante o período de espera, mantida fora de refrigeração. No restaurante A, a temperatura da alface pronta para consumo era de 22,3 °C, no restaurante B era de 21,9 °C e, no restaurante C, de 19,2 °C. O tempo após preparo até o final da distribuição para consumo observado foi de 4 h, aproximadamente, em todos os restaurantes. É possível afirmar que as condições de processamento dos restaurantes proporcionam tempo e temperatura suficientes para que *K. pneumoniae* ultrapasse a fase lag e cresça na alface.

Armazenada à temperatura de 30 °C, por um tempo de 20 h, a alface apresentou murchamento das folhas e alteração de cor, com surgimento de manchas amareladas. Nas beiradas do corte, ao invés de marrom, a cor era negra. Provavelmente, a alface não seria consumida nessas condições.

Na temperatura abusiva de 40 °C, a duração da fase lag predita foi de 0,99 h. Esta temperatura é possível de ser alcançada em dias de verão, no ambiente quente e úmido das cozinhas dos restaurantes.

O efeito da temperatura pode ser interpretado pelos valores dos parâmetros cinéticos nas temperaturas ensaiadas. Em temperaturas mais baixas a taxa específica de crescimento máximo foi, também, baixa. A 5 °C, a taxa de crescimento predita foi 0,022  $h^{-1}$  e a 10 °C, de 0,070  $h^{-1}$ . Porém, a 20 °C, temperatura de interesse para essa

pesquisa, o valor de  $\mu_{\max}$  predito foi 0,199. Sob temperaturas de abuso,  $\mu_{\max}$  apresentou taxas altas. Na temperatura de 30 °C  $\mu_{\max}$  foi 0,540 h<sup>-1</sup> e a 40 °C foi 0,859 h<sup>-1</sup>.

A densidade populacional variou nos períodos de tempo amostrado com as temperaturas testadas. Notou-se que quanto mais alta a temperatura, mais elevada a população de *K. pneumoniae* na alface. Nos ensaios a 5 °C, a população máxima predita foi 6,19 log UFC·g<sup>-1</sup> para o período de tempo ensaiado de 187 horas. Na temperatura de 10 °C a duração do ensaio foi de 120 horas, e a densidade populacional predita foi de 6,82 log UFC·g<sup>-1</sup>. Porém, a quantidade de células no inóculo da população inicial influenciou a densidade da população final. Nos ensaios realizados, a 20 °C a população inicial predita foi mais elevada, sendo 3,0 log UFC·g<sup>-1</sup>. Por isso, os valores preditos para o final do período ensaiado foi 7,99 log UFC·g<sup>-1</sup>. Essa população final foi mais alta em 0,54 log UFC·g<sup>-1</sup> do que a predita nos ensaios a 30 °C. A 30°C a população inicial era mais baixa, de 2,46 log UFC·g<sup>-1</sup> e após o período de ensaio, a população final foi predita em 7,45 log UFC·g<sup>-1</sup>. Foi evidenciada a importância que tem a carga microbiana após o processamento para a qualidade e segurança dos alimentos. Alimentos que apresentam inicialmente contaminação mais baixa, conseqüentemente, poderão ter prazo de validade maior. Também, serão mais seguros para consumo por apresentarem contagens de microrganismos menores por grama de alimento.

A 40 °C, a população inicial de 2,90 log UFC·g<sup>-1</sup> células de *K. pneumoniae* aumentou para a população mais alta observada nesse experimento, sendo 8,29 log UFC·g<sup>-1</sup> após 10 h de observação.

Koseki e Isobe (2005a) informaram sobre os parâmetros de crescimento de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* em alface do tipo *iceberg* obtidos de curvas ajustadas com o modelo Baranyi e Roberts, utilizando-se a macro DMFit. Os parâmetros de crescimento informados foram comparados com os obtidos nessa pesquisa para *K. pneumoniae*. Na temperatura de 5°C, *L. monocytogenes* apresentou fase lag de 52,4 h e foi mais longa que a de *K. pneumoniae* nas mesmas condições de temperatura, que foi estimada nesse experimento em 42,57 h. Porém, a taxa específica de crescimento foi idêntica para ambos os microrganismos a 5 °C. Para *L. monocytogenes*, essa taxa foi de 0,026 h<sup>-1</sup>, valor próximo da predita para *K. pneumoniae*, de 0,022 h<sup>-1</sup>. E, a densidade populacional máxima predita para *L. monocytogenes* foi de 5,58 e para *K. pneumoniae*, de 6,19 (KOSEKI; ISOBE, 2005a).

Na temperatura de interesse, a 20 °C, a fase lag de *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* em alface tiveram um tempo de duração predito em 1,74 h, 3,9 h, 5,17 h e 5,23 h, respectivamente. Nessa temperatura, o valor da taxa específica de crescimento máximo de *K. pneumoniae* foi de 0,199. Para *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*, essa taxa foi de 0,26 h<sup>-1</sup>, para ambos os microrganismos. Taxa

mais baixa de crescimento foi de *L. monocytogenes*, predita em 0,147 h<sup>-1</sup>. Quanto à densidade populacional máxima a 20 °C, *K. pneumoniae* apresentou contagens mais altas de 7,14 log UFC·g<sup>-1</sup>. A população máxima de *E. coli* O157: H7 foi 6,33 log UFC·g<sup>-1</sup>, de *Salmonella* spp, foi de 6,01 log UFC·g<sup>-1</sup> e *L. monocytogenes* foi 6,19 log UFC·g<sup>-1</sup> (KOSEKI; ISOBE, 2005 a).

Koseki e Isobe (2005b) compararam o crescimento de *L. monocytogenes* em alface sanitizada e na alface *in natura*, sem redução da carga bacteriana natural. Na alface descontaminada, a densidade populacional máxima foi de 1 ciclo log mais alta em todas as temperaturas testadas. Carlin, Nguyen-the e Morris (1996) encontraram resultados semelhantes nos ensaios de *L. monocytogenes* crescendo em endívia. Palmi e Buchanan (2002) informaram que a densidade populacional de *L. monocytogenes* em brotos de alface descontaminados era cerca de 1 ciclo log mais alta que em brotos não tratados. Esses autores concluíram que o crescimento do microrganismo estudado foi inibido pela microbiota natural do alimento. Explicaram que bactérias do gênero *Pseudomonas* constituem a microbiota natural das hortaliças. Como são psicrotróficas, crescem rapidamente em temperaturas de refrigeração. O crescimento delas é capaz de inibir outros microrganismos, principalmente os maus competidores e mesófilicos, como são muitas das bactérias patogênicas.

#### **4.7.2. Efeitos da variável ambiental sobre os parâmetros de crescimento utilizando modelos secundários**

Modelos secundários foram utilizados para descrever como os parâmetros cinéticos do crescimento, obtidos com os modelos primários, mudaram com os fatores ambientais. Nesse trabalho, o fator ambiental avaliado foi somente a temperatura.

##### **4.7.2.1. Efeito da temperatura na duração da fase lag**

O período lag leva em conta o tempo que a bactéria leva para se adaptar às condições ambientais novas e iniciar a reprodução celular, evidenciado pelo aumento das contagens de colônias nas placas. Os modelos de Arrhenius e Weibull foram testados para descrever o efeito da temperatura sobre a duração da fase de adaptação da população de *K. pneumoniae* na alface.

A Equação 66 apresenta o modelo Arrhenius e a Equação (67) o modelo Weibull, para determinar a relação entre a duração da fase lag e a temperatura.

$$\lambda = 1,2659e^{\frac{17,5905}{T}} \quad (\text{Eq. 66})$$

$$\lambda = 1473,853T^{-2,202}$$

(Eq. 67)

Em que:

$\lambda$  é o parâmetro do modelo a determinada temperatura T (°C);

Os modelos estudados foram capazes de descrever os efeitos da temperatura na duração da fase lag do crescimento de *K. pneumoniae* na folha de alface. Pode ser observado na Figura 34 que, quando ocorre aumento da temperatura, há diminuição da duração da fase lag. A curva obtida pelo ajuste aos dados da duração da fase lag a diferentes temperaturas apresentou a forma de uma exponencial negativa. Contudo, nota-se que o modelo de Weibull ajustou-se melhor aos dados para descrever a curva que representa essa dependência.

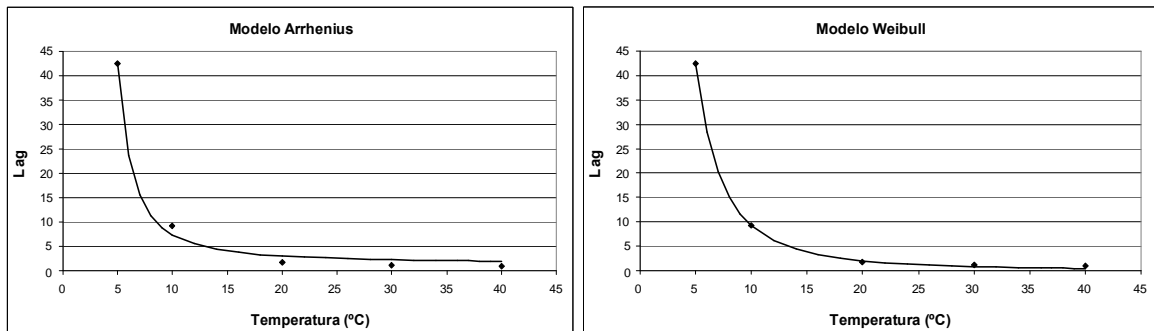


Figura 34 - Efeito da temperatura na duração da fase lag descrita pelos modelos Arrhenius e Weibull para os cultivos de *Klebsiella pneumoniae* em alface armazenada nas temperaturas de 5 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C e 40 °C.

Os parâmetros estatísticos que validaram o modelo foram coeficiente de correlação ( $R^2$ ), raiz quadrada do quadrado médio do resíduo, fator bias e fator exatidão. Os valores calculados dos índices estatísticos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Valores dos índices estatísticos para os modelos secundários Arrhenius e de Weibull em descrever a duração da fase lag em função da temperatura

Índices estatísticos	Arrhenius	Weibull
$R^2$	0,99	0,99
RMSE	1,2227	0,3092
BIAS	1,4117	0,8204
Exatidão	1,5453	1,2939

Os modelos Arrhenius e Weibull conseguiram explicar os dados da duração da fase lag com bom ajuste. O  $R^2$  para ambos os modelos foi de 0,99.

A qualidade do ajuste em relação à raiz quadrada do quadrado médio do resíduo (RMSE) para o modelo Weibull foi de 0,31, bem abaixo do apresentado pelo modelo Arrhenius, também testado. O fator bias avaliou o modelo Weibull, e o índice foi de 0,8204. O valor menor que um indicou que o modelo apresenta falha leve em descrever os dados. Mas, falha pelo lado seguro. O fator bias calculado para o modelo Arrhenius foi de 1,41, o que indicou tendência de 41%, em média, de predição pelo lado não seguro.

O fator exatidão calculado para o modelo Weibull foi de 1,29, indicando que o modelo realizou predições com desvios de 29% do valor experimental. Para o modelo Arrhenius o valor calculado para o fator exatidão foi de 1,54 e indicou que o modelo realizou predições com desvios de 54% do valor experimental. Ao ser avaliado pelo fator exatidão, o modelo Weibull apresentou melhor qualidade em relação ao Arrhenius, pois quanto maior o fator exatidão, menos exato é o modelo.

Conclui-se que o modelo secundário que descreveu melhor o efeito da temperatura na duração da fase lag, nesse experimento, foi o modelo Weibull.

#### 4.7.2.2. Efeito da temperatura na taxa específica de crescimento máximo

Admitiu-se que a taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_{\max}$ ) é determinada pelos fatores do ambiente externo. As taxas de crescimento máximo obtidas pelo modelo primário de Baranyi e Roberts foram modeladas como uma função da temperatura por quatro modelos secundários da microbiologia preditiva, ou seja, os modelos de Ratkowsky, Ratkowsky modificado, Arrhenius e Weibull. Estão apresentadas no Quadro 3 as equações ajustadas com os dados obtidos usando-se o modelo primário para determinar a relação entre a taxa específica de crescimento máximo e a temperatura.

Quadro 3 - Equações ajustadas nos diversos modelos para predição da taxa específica de crescimento máximo pelo efeito da temperatura

Modelo	Equação
Ratkowsky	$\sqrt{\mu_{\max}} = 0,0226(T + 1,32)$
Ratkowsky modificado	$\sqrt{\mu_{\max}} = 0,023(T + 1,0824)(1 - e^{1,2093(T - 43,31)})$
Arrhenius	$\mu_{\max} = 3,48143 e^{\frac{-56,02045}{T}}$
Weibull	$\mu_{\max} = 0,000819T^{1,888921}$

Em que:

$\mu_{\max}$  é a taxa de crescimento; e

T é a temperatura.

Na Figura 35 é apresentado o efeito de diferentes temperaturas na taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_{\max}$ ), ajustados com os modelos Ratkowsky, Ratkowsky modificado, Linear e Weibull.

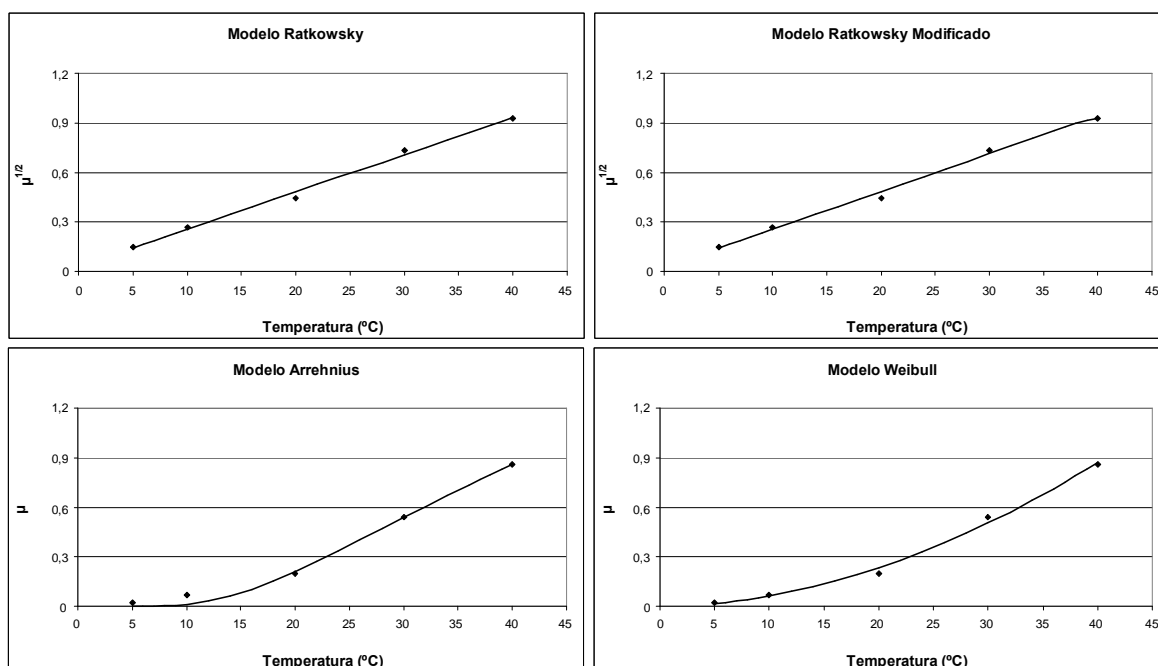


Figura 35 - Efeito da temperatura na taxa específica máxima de crescimento  $\mu_{\max}$ , ajustados com os modelos Ratkowsky, Ratkowsky modificado, Linear e Weibull.

Observa-se pela análise dos gráficos, que os modelos estudados foram capazes de descrever a relação de  $\mu_{\max}$  com a temperatura. Porém, a equação do modelo Arrhenius não se ajustou bem aos valores de  $\mu_{\max}$ , nas temperaturas de 5 °C e 10 °C.

Fu e Labuza (1993) mostraram que a equação de Arrhenius se aplicava para determinada faixa de temperatura. Segundo os autores, uma vez que o crescimento microbiano é um processo bioquímico, a influência da temperatura na velocidade de crescimento específica pode ser caracterizada pela energia de ativação, desde que todos os outros fatores sejam mantidos constantes. O modelo trabalha bem dentro de uma faixa de temperatura limitada, e que extrapolação acima da temperatura ótima ou abaixo ou próximo da mínima para o crescimento pode fornecer um ajuste pobre dos dados experimentais (SCHAFFNER; LABUZA, 1997).

Avaliou-se o desempenho dos modelos de Ratkowsky, Ratkowsky modificado, Arrhenius e Weibull em descrever a taxa de crescimento de acordo com a temperatura. Além disso, os modelos foram comparados. Os índices estatísticos, coeficiente de

correlação ( $R^2$ ), raiz quadrada do quadrado médio do resíduo, fator bias e fator exatidão foram usados. Os valores calculados dos índices estatísticos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores dos índices estatísticos para os modelos secundários: Modelo de Ratkowsky, Modelo de Ratkowsky modificado, Modelo Arrhenius e Modelo de Weibull

Índices	Ratkowsky	Ratkowsky modificado	Arrhenius	Weibull
$R^2$	0,99	0,99	0,99	0,99
RMSE	0,0208	0,0203	0,0280	0,0233
BIAS	0,9959	0,9929	0,2117	0,9571
Exatidão	1,0379	1,0409	4,8391	1,1224

Os valores de  $R^2$  dos modelos para predição da taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_{max}$ ) foram de 0,99. Por isso, as demais análises estatísticas auxiliaram a compreensão dos comportamentos dos modelos secundários estudados.

Os dados da Tabela 16 mostram que as melhores respostas preditivas foram proporcionadas pelos modelos Ratkowsky, Ratkowsky modificado e Weibull, indicando que esses modelos apresentaram um bom ajuste aos dados de  $\mu_{max}$  em relação à temperatura.

Os índices do RMSE foram de 0,0208 para o modelo Ratkowsky, 0,0203 para o modelo Ratkowsky modificado, 0,0280 para o modelo Arrhenius e 0,0233 para o modelo Weibull. Significando que na predição os desvios-padrão médios eram baixos.

O fator bias calculado foi de 0,9959 para o modelo Ratkowsky, de 0,9929 para o modelo Ratkowsky modificado, e de 0,9571 para o modelo Weibull. Os valores próximos de um indicaram que os valores preditos pelos modelos secundários estão próximos dos valores de  $\mu_{max}$  apresentados pelos modelos primários. Por serem menores que 1 indicaram, também, que os modelos falham levemente em descrever os dados, mas, pelo lado seguro. Ou seja, em termos de crescimento de populações microbianas, o modelo está fazendo predições seguras indicando contaminação do alimento maior que realmente ocorre. Logo, indica população de *K. pneumoniae* na alface maior que existe.

O fator bias, calculado para o modelo Arrhenius, foi de 0,2117. Um valor muito baixo e distante de 1. Apesar de ser pelo lado seguro, a falha em descrever a relação de  $\mu_{max}$  com a temperatura é de 79%, aproximadamente.

O fator exatidão calculado foi de 1,0379 para o modelo Ratkowsky, 1,0409 para o modelo Ratkowsky modificado e de 1,1224 para o modelo Weibull. Esses índices indicaram que os modelos Ratkowsky, Ratkowsky modificado e Weibull falharam



levemente em descrever a influência da temperatura na taxa específica de crescimento em 3,8%, 4,0% e 12%, respectivamente. O modelo Arrhenius apresentou o valor do fator bias de 4,8391 e portanto, falhou em descrever os dados. O fator exatidão tem valor sempre maior que 1. Mas, quanto maior o valor do fator exatidão calculado, menos exato será o modelo.

Os índices estatísticos, fator bias e fator exatidão, foram bastante úteis na comparação do desempenho dos modelos secundários. Estes apontaram que o modelo Arrhenius não conseguiu explicar a influência da temperatura na taxa de crescimento de *K. pneumoniae* na alface armazenada a diferentes temperaturas, mesmo com coeficiente de correlação de 0,99. Foi observado que o modelo não ajustou aos valores estimados para  $\mu_{\max}$  nas temperaturas baixas. A falta de ajuste ocorreu porque os valores preditos de  $\mu_{\max}$  em relação aos valores observados apresentaram muita diferença em relação à ordem de grandeza. Essa diferença foi captada pelos índices estatísticos, fator bias e fator exatidão, bastante sensíveis. O modelo, que a princípio aparentava bom desempenho, apresentou resultados ruins para prever o crescimento de *K. pneumoniae* na alface armazenada sob temperaturas baixas.

Desses resultados conclui-se, então, que temperaturas baixas de 5 °C e, também, de 10 °C são suficientes para inibir o crescimento de *K. pneumoniae* na alface. E que os índices estatísticos foram suficientes para comparar a competência dos modelos testados.

Com base nas análises estatísticas, o modelo secundário que ajustou e descreveu melhor o efeito da temperatura na taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_{\max}$ ) foi o de Ratkowsky. Este modelo foi usado por Koseki e Isobe (2005a) para descrever a dependência da temperatura sobre  $\mu_{\max}$  das bactérias *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* crescendo em alface, otidas com o modelo de Baranyi e Roberts. O modelo de Ratkowsky ajustou-se bem com  $R^2$  de 0,99. Os autores não usaram outros índices estatísticos para validar o modelo.

#### **4.8. Avaliação da exposição à *Klebsiella pneumoniae* em restaurantes comerciais através do consumo da alface**

A cadeia de produção foi observada e analisada. Foram determinadas as mudanças na prevalência e no número de microrganismos em cada etapa da cadeia de produção de alface. Na etapa do campo à mesa, as contagens de *K. pneumoniae* variaram de 3,85 log UFC·g<sup>-1</sup>, do campo do produtor 1, para 4,1 log UFC·g<sup>-1</sup> no momento da entrega ao restaurante A. Após o processamento, no restaurante A, as contagens foram de 3,50 log UFC·g<sup>-1</sup>. Na alface do produtor 2, as contagens de *K. pneumoniae* na

alface do campo foram superiores a  $3,0 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  e, no momento da entrega ao restaurante B, foram observadas em  $3,54 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . Após o preparo para consumo, a alface do restaurante B apresentou contagens, cerca de 1 ciclo logarítmico mais baixas de  $2,44 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . As amostras de alface coletadas no campo do produtor três e as que foram entregues ao restaurante C apresentaram contagens de *K. pneumoniae* superiores a  $3,0 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ . Porém, as contagens na alface pronta para consumo foram de  $3,43 \log \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  no restaurante C. De modo geral, a prevalência de *K. pneumoniae* foi muito baixa nas amostras do campo. Dentre as 27 amostras analisadas, *K. pneumoniae* foi encontrada em apenas uma amostra, o que representou 3,7% delas. Porém, no momento da entrega, a porcentagem de amostras contaminadas aumentou para cinco, e o percentual para 18,5%. No entanto, a mais alta prevalência desta bactéria foi na alface pronta para consumo. A enterobactéria *K. pneumoniae* foi prevalente em 82% das amostras analisadas. Esse resultado sugeriu para essa pesquisa que a contaminação ocorreu durante processamento e acondicionamento.

Em seguida, foram observadas as práticas usadas no processamento da alface. A hortaliça é lavada e sanitizada com solução de cloramina orgânica ou com solução diluída de ácido acético, nas concentrações de  $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (p/v) e de 0,16% (v/v), respectivamente. Usadas nessas mesmas concentrações nos testes de desafio, a inativação de *K. pneumoniae* aderida à alface, tratada com cloramina orgânica, foi de 1,51 ciclos logarítmicos após 8 min de contato. A inativação usando solução diluída de ácido acético foi de 1,12 ciclos logarítmicos, após 60 min de contato. Observou-se que a alface fica pronta para consumo pelo menos 1 h antes do momento de servir e permanece fora de refrigeração até o final da distribuição por um período de 4 h.

A temperatura ao final do processamento era idêntica à temperatura da água utilizada para o tratamento sanitizante, sendo frequente  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Na Tabela 17 encontram-se, resumidamente, a descrição da cadeia de produção e as relações de entrada e saída em cada etapa do processamento.

A terceira categoria de dados está associada à definição da população que está exposta ao perigo microbiológico.

Os resultados da pesquisa mostraram que a população usuária dos restaurantes é composta, na sua maioria, de jovens adultos, com idade variando entre 10 e mais de 40 anos, com predominância do sexo feminino. A frequência de consumo de alface varia de 1 a 7 vezes por semana. Como a exposição ao perigo está associada à quantidade e frequência de consumo de alface, os tamanhos das porções foram determinados. Dentre os usuários dos restaurantes, aproximadamente metade da população (47,6%) consome porções pequenas de alface de 8,0 g, e a outra metade é composta dos usuários que

consomem porções médias e grandes, que pesam 20,0 g e 30,0 g, respectivamente. Somente 1,8% da população de usuários respondentes da pesquisa não consome alface.

Tabela 17 - Prevalência e log UFC·g<sup>-1</sup> de *Klebsiella pneumoniae* em 27 amostras em cada estágios da cadeia de produção da alface Vitória de Santo Antão, desde a produção primária até a mesa do consumidor, em razão do processo, tempo e temperatura

Estágios	Processo	Prevalência	Concentração log UFC·g <sup>-1</sup>	t (h)	T (°C)	Etapas do processamento
1	1ª coleta de amostras	3,7%	3,85	00:00	23,8	Colheita no campo
2	Remoção			01:00		Remoção de raízes, folhas velhas e feias no campo
3	Mistura e contaminação					Lavagem das cabeças de alface por imersão no tanque
4	Contaminação cruzada			02:00		Embalagem para transporte: contato com superfícies e mãos
5	Crescimento			13:00	18,8	Transporte e estocagem sem refrigeração antes da entrega
6	2ª coleta de amostras	18,5%	3,0 - 4,0	14:00		Entrega no restaurante
7	Remoção e inativação dos microrganismos			00:00	20,0	Lavagem e sanitização no restaurante
8	Mistura e contaminação cruzada			01:00		Corte e acondicionamento: contato com superfícies de trabalho e mãos
9	3ª coleta de amostras	81,5%	2,44 - 3,50	01:00		Espera para distribuição
10	Crescimento			01:00 - 04:00	20,0	Distribuição sem refrigeração
11	Consumo			01:00 - 04:00		Microrganismos ingeridos na porção

Foram calculadas as possíveis quantidades totais de *K. pneumoniae*, em log UFC g<sup>-1</sup>, consumida pelos usuários dos restaurantes comerciais A, B, C, a partir das

concentrações iniciais determinadas ao final do processamento nos restaurantes. Os valores da concentração de *K. pneumoniae*, após os tempos de 1 h, 2 h, 3 h e 4 h, foram estimados a partir da equação do modelo Baranyi, determinada para a curva de crescimento, à temperatura de 20 °C. Os valores calculados estão apresentados na Tabela 18. A quantidade ingerida de células em cada porção pode, então, ser estimada multiplicando-se o valor de UFC g<sup>-1</sup> pelo tamanho da porção consumida. Por exemplo, se um usuário do Restaurante A consumir uma porção média de 20,0 g após três horas de preparo, a quantidade ingerida de células de *K. pneumoniae* será de 5,02 log UFC, sendo a prevalência dessa bactéria determinada em 81,5% na alface pronta para consumo. Porém, não foi encontrada na literatura consultada a relação de dose resposta disponível para *K. pneumoniae*.

Li et al. (2008) informaram que a dose intranasal de 5 log UFC de *K. pneumoniae* resultou em 100% de mortalidade de ratos infectados dentro de sete dias. Com base em estudos epidemiológicos, a concentração de 5 log UFC·g<sup>-1</sup> é, geralmente, considerada um valor crítico (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Tabela 18 - Valores observados e valores preditos da concentração de células de *Klebsiella pneumoniae* na alface ao ponto de consumo a 20 °C após 1 h, 2 h, 3 h e 4 h após preparo

<b><i>K. pneumoniae</i> na alface</b>	<b>Observados</b>	<b>Preditos</b>			
	<b>Y<sub>0</sub> log UFC g<sup>-1</sup></b>	<b>Y<sub>1</sub> log UFC g<sup>-1</sup></b>	<b>Y<sub>2</sub> log UFC g<sup>-1</sup></b>	<b>Y<sub>3</sub> log UFC g<sup>-1</sup></b>	<b>Y<sub>4</sub> log UFC g<sup>-1</sup></b>
Restaurante A	3,50	3,51	3,57	3,72	3,88
Restaurante B	2,44	2,45	2,51	2,66	2,83
Restaurante C	3,43	3,44	3,50	3,65	3,81

## 5. CONCLUSÕES

*Escherichia coli* O157:H7 aderiu em superfície de folhas de alface cultivar Vitória de Santo Antão, atingindo valores acima de 5 log UFC·cm<sup>-2</sup>. As imagens obtidas por microscópica eletrônica de varredura mostraram que a superfície foliar é irregular e constituída por camada cuticular coberta de ceras amorfas. Além disso, apresentam um estômato para cada nove células epiteliais, e esse foi o sítio preferencial para a adesão do microrganismo. As células microbianas formaram agrupamentos e alojaram-se em depressões, dobras naturais e ao longo de nervuras da folha da alface.

A alface tem boa aceitação sendo consumida pela maioria dos 227 usuários respondentes dos questionários aplicados nos restaurantes comerciais. Os principais consumidores foram jovens adultos, do sexo feminino e que consumiam porções pequenas (8,0 g) e médias (20,0 g) de alface, entre três e sete vezes por semana.

Nos restaurantes, o ar dos ambientes de processamento, as mãos dos manipuladores e as superfícies de contato com alface apresentaram condições insatisfatórias de higiene, não atendendo às recomendações da APHA.

No campo, o método e a água de lavagem disseminaram *E. coli* e *C sakazakii* na alface. Nas amostras coletadas após o processamento, *K. pneumoniae* foi prevalente em 81,5% delas, sendo as mãos dos manipuladores a provável via de contaminação.

A análise de perigos permitiu concluir que *E. coli*, *C. sakazaki* e *K. pneumoniae* foram os microrganismos potencialmente perigosos à saúde humana encontrados na alface pronta para consumo, sendo estes selecionados para a continuidade dos estudos, estabelecidos pelo sistema APPCC.

Foi avaliada a ação antimicrobiana de soluções preparadas a partir de vinagre e de cloramina orgânica. A inativação ou remoção de células sésseis de *K. pneumoniae*, usando-se uma solução de ácido acético 1,5% (v/v), não foi maior que a da lavagem somente com água. Porém, a solução de 170 mg·L<sup>-1</sup> de CRT preparada a partir de cloramina orgânica e de ácido acético 1,5% acrescentada de 0,5% de cloreto de sódio

tiveram desempenho semelhante na redução de populações de *K. pneumoniae* aderidas à alface.

O modelo exponencial de dois termos foi apropriado para descrever a cinética de inativação de *K. pneumoniae* aderida à folha de alface. A população microbiana apresentou resistência heterogênea aos tratamentos, com uma fração mais sensível e outra resistente. A cloramina orgânica inativou 94,6% da população inicial de *K. pneumoniae* com 2 minutos de contato, redução observada de 1,27 ciclos log. Com o tempo de 8 min houve redução de 1,51 ciclos log. O valor D, calculado para a fração sensível, foi de 0,59 min e da fração resistente, de 25,79 min.

A solução de 0,18% de ácido acético não foi eficiente. Após 2,5 min de contato, houve redução de 0,37 ciclos log da população de *K. pneumoniae* e, com 60 min, a redução foi de 1,12 ciclos log. O valor D estimado para a fração sensível da população foi de 4,22 min e a resistente, de 124,6 min.

Foi modelado o crescimento de *K. pneumoniae* aderida à alface armazenada em cinco temperaturas. O modelo primário de Baranyi e Roberts ajustou-se melhor aos dados experimentais que o modelo Gompertz. Sob temperaturas baixas, de 5 °C e 10 °C, houve aumento na duração da fase lag ( $\lambda$ ), mas, a taxa específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), diminuiu. A temperatura da alface pronta para consumo nos restaurantes era 20 °C, aproximadamente. Nessa temperatura, a duração da fase lag foi estimada em 1,74 h e, a taxa específica de crescimento máximo em 0,199 h<sup>-1</sup>.

Os modelos secundários, de Weibull e de Ratkowsky, foram estatisticamente melhores que outros modelos analisados para descrever como a duração da fase de adaptação ( $\lambda$ ) e a taxa de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) mudaram com a temperatura. O aumento da temperatura diminuiu o tempo de adaptação e aumentou a taxa específica de crescimento de *K. pneumoniae* na alface Vitória de Santo Antão.

Como os tratamentos não são eficazes e não haverá outro para inativar os microrganismos, a temperatura e o tempo de exposição foram pontos críticos de controle identificados na cadeia de produção da alface Vitória de Santo Antão do campo à mesa. Temperaturas baixas, entre 5 e 10 °C, após processamento pode inibir o crescimento de *K. pneumoniae* na alface durante distribuição em restaurantes comerciais.

Observou-se que, uma hora após o processamento é, geralmente, o tempo que a alface aguarda fora de refrigeração até o momento da distribuição e coincide com a duração da fase lag. Portanto, no momento em que os usuários dos restaurantes consomem alface, *K. pneumoniae* está em fase logarítmica de crescimento.

Concluiu-se que se um usuário dos restaurantes A e B que consumir 20 g de alface 3 h após preparo, tem grande probabilidade de ingerir quantidades acima de 10<sup>5</sup> células de *K. pneumoniae*.

## 6. REFERÊNCIAS

ABEE, T.; WOUTERS, J. A. Microbial stress response in minimal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 65-91, 1999.

ABRAHAM, G. et al. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3073-3080, 1990.

ADAMS, M. R.; HARTLEY, A. D.; COX, L. J. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. **Food Microbiology**, v. 6, p. 69-77, 1989.

ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD. INFORMATION PAPER ACM/745. Microbiological status of ready to eat fruit and vegetables. 2005.

ALEXANDER, D. M.; ST JOHN, A. C. Characterization of the carbon starvation-inducible and stationary phase-inducible gene *slp* encoding an outer membrane lipoprotein in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 11, p. 1059-1071, 1994.

ARNOLD, C. N. et al. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during acetate-induced acid tolerance response. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2178-2186, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington, DC. 1994. 1904 p.

AUGUSTIN, J. C.; ROSSO, L.; CARLIER, V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 38, p. 137-146, 1999.

AUGUSTIM, J. C. et al. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1706-1710, 2000.

AXTELL, C. A.; BEATTIE, G. A. Construction and characterization of a *proU-gfp* transcriptional fusion that measures water availability in a microbial habitat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4604-4612, 2002.

BAILEY, J. S. Detection of *Salmonella* cells within 24-26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX system. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 792-795, 1998.

BAKER, E. A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTTLER, D. F.; ALVIN, K.L; PRICE, C. E. (Ed.). **The Plant Cuticle**. London: Academic Press, 1982. p.140-161.

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

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal food microbiology**, v. 26, p. 199-218, 1995.

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

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 261-277, 2004.

BAUMGARTNER, A. et al. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. **International Journal of Food Microbiology**. 2009.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 145-172, 1995.

BEESE, N. G. et al. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 43-51, 2006.

BEGOT, C. et al. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, p. 225-232, 1996.

BEMRAH. N. et al. Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p.17-30, 2003.



BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 204-216, 1996.

BEUCHAT, L. R. Use of sanitizers in raw fruit and vegetable processing. In: ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M. S.; LOPEZ-MALO, A. (Ed.) **Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental Aspects and Applications**. Gaithersburg (MD), USA: Aspen Publishers, 2000. p. 63-78.

BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 413-423, 2002.

BEUCHAT, L. R.; ADLER, B. B.; LANG, M. M. Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1238-1242, 2004.

BEUCHAT, L. et al. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth and inactivation. **International Journal of Food Microbiology**, 2009.

BJORNSDOTTIR, K.; BREIDIT, J. F.; MCFEETERS, R. F. Protective effect of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 660-664, 2006.

BLACKBURN, C. W. Modelling shelf-life. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. **The stability and shelf-life of Food**. Cambridge, England: CRC Press LLC, 2000. p. 55-75.

BLOOMFIELD, S. F. et al. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 86-94, 1994.

BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. New York: Jones and Bartlett Publishers, 1991. 452 p.

BRACKETT, R. E. Influence of modified atmosphere packaging on the microflora and quality of fresh bell peppers. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 255-257, 1990.

BRACKETT, R. E.; SPLITTSTOESSER, D. F. Fruits and vegetables. In: DOWNES, P. F.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 515-520.

BRANDL, M. T. Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 5285-5289, 2008.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 128, n. 182, p.18055-18059, 20 set. 1990. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993. Aprova o Regulamento Técnico Para Inspeção Sanitária de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.18415-18419, 02 dez. 1993. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do serviço de Inspeção Federal - SIF, de acordo com o manual genérico de procedimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 24. 16 mar. 1998. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 set. 2004.

BRAUN, P.; SUTHERLAND, J. P. Predictive modelling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of selected *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas hydrophila*. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p. 257-266, 2005.

BROCK, T. D. et al. Growth and its control. In: BROCK, T. D.; MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms**. 7. ed. Prentice Hall, 1994. p. 321-360.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-7, 1999.

BRYAN, F. L. Infections and intoxications due to other bacteria. IN: RIEMANN, H.; BRYAN, F. L. (Ed.) **Foodborne Infections and intoxications**. 2. ed. New York: Academic Press, 1979. p. 211-297

BUCHANAN, R. L.; PHILIPS, J. G. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 370-376, 1990.

BUCHANAN, R. L. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. **Journal of Food Safety**, v.11, p.123-134, 1991.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C. Risk assessment and predictive microbiology. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 31-36, 1996.

BUCHANAN, R. L.; GOLDEN, M. H. Interactions between pH and malic acid concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Safety**, v.18, p. 37-48, 1998.

BUCHANAN, R. L.; EDELSON-MAMMEL, S. G. pH-dependent, stationary phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of different acidulants. **Journal of Food Protection**, v.62, p. 211-218, 1999.

BUCHANAN, R. L. et al. Influence of acidulant identity on the effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 21, p. 51-57, 2004.

BUCK, J. W., WALCOTT, R. R., BEUCHAT, L. R. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. **Plant Health Progress**. 2003. Disponível em <[www.apsnet.org/online/feature/safety/links.asp](http://www.apsnet.org/online/feature/safety/links.asp)> Acesso em 01 Maio 2008.

BURNETT, S. L.; CHEN, J.; BEUCHAT, L. R. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 4679-4687, 2000.

CAETANO, R. C. P. S. **Crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em dieta enteral modificada**. 2003. 54 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C.; MORRIS, C. E. Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* minimally processed fresh broad-leaved endive (*Chicorium endivia* var. *latifolia*). **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 698-703, 1996.

CASSETARI, V. C. et al. Surto em berçário por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido atribuído à colonização de profissional de saúde portador de oncomicosose. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 4, 2006.

CHACALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpetcreeper with glyphosate. **Weed Science Society of America**, v. 49, p. 156-163, 2001.

CHANG J. M.; FANG, T. J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 24, p. 745-751, 2007.

CHEN, H.; HOOVER, G. D. Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p.161-171, 2003.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 783-787, 2000.

CHERRY J. P. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. **Food Technology**, v. 53, p. 54-57, 1999.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Draft principles and application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system**. Codex Alimentarius Commission Document Alinorm 93/13 appendix VI, November 1991.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Appendix IV. Working principles for risk analysis for application in the framework of the Codex Alimentarius. In: **Report of the Twenty-Sixty session of the Codex Alimentarius Commission**. Rome. 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/y4800e/y4800e0o.htm>> Acesso em: 09 abr. 2007.

CONWAY, W. S; LEVERENTZ, B.; SAFTNER, R. A. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. **Plant Disease**, v. 84, p. 177-81, 2000.

COOKE, E. M. et al. *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients. **The Journal of Hygiene**, v. 84, p. 97-101, 1980.

COX, N. A. et al. Effectiveness of sampling methods for *Salmonella* detection on processed broilers. **Journal of Food Protection**, v. 41, p. 341-343, 1978.

DALGAARD, P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 305-317, 1995.

D'AOUST, J. Y. Infective dose of *Salmonella Typhimurium* in cheddar cheese. **American Journal of Epidemiology**, v. 122, p. 717-720, 1985.

DAVIS, T. J.; MATSEN, J. M. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. **The Journal of Infectious Disease**, v. 130, p. 402-405, 1974.

DODDS, K. L. An introduction to predictive microbiology and the development and use of probability models with *Clostridium botulinum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p.139-143, 1993.

DONG, Y.; et al. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago trunculata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1783-1790, 2003.

DUFFY, L. L.; VANDERLINDE, P. B.; GRAU, F. A. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH,  $a_w$ , nitrite and ascorbate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 377-390, 1994.

DYCHDALA, G. R. Chlorine and chlorine compounds. In: BLOCH, S. S. (Ed.) **Disinfection, sterilization and preservation**. 2. ed. Philadelphia PA: Lea, Febiger, 1977. p. 167-195.

EDELSON-MAMMEL, S.; PORTEOUS, M. K.; BUCHANAN, R. L. Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, and the impact of habituating the cells to an acidic environment. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, p. 201-207, 2006.

ENTANI, E. et al. Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.61. n. 8, p.953-959,1998.

EUROPEAN COMMISSION. HEALTH AND CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. Risk assessment of food borne bacterial pathogens: quantitative methodology relevant for human exposure assessment. 2002.

EVANCHO, G. M. et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, P. F.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 25-35.

FANG, T. J.; HSUEH, Y. T. Effect of chelators, organic acid and storage temperature on growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, using response surface methodology. **Journal of Food Drug Analysis**, v. 8, p. 187-194, 2000.

FANG, T. J. Bacterial contamination of ready-to-eat foods: concern for human toxicity. **Reviews in Food and Nutrition Toxicity**, v. 6, p. 143-171, 2005.

FAYER, R. Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary parasitology**, v. 126, p. 37-56, 2004.

FETT, W. F. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on laboratory-inoculated mung bean seed by chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 848-852, 2002.

FIDÉLIS, G. A. **Avaliação das boas práticas de preparação em restaurantes institucionais**. 2005. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2000. 402 p.

FINGER, L. F.; VIEIRA, G. **Controle da perda pós-colheita de água em produtos hortícolas**. Viçosa, MG: Ed. UFV. 1997.

FOEGEDING, P. M.; BUSTA, F. F. Chemical food preservatives. In: Block, S. E. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 802-832.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Surveillance Programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe**. FAO/WHO collaborating centre for research and training in food hygiene and zoonoses, Berlin. 1991.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines. FAO/WHO. Microbiological risk assessment series, n. 3. 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of a joint FAO/WHO workshop on the provision of scientific advice to Codex and member countries**. Geneva: FAO/WHO, 2004.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidance to governments on the application of HACCP in small and/or less-developed food businesses**. 2006a .

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. WORLD HEALTH ASSOCIATION. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powered infant formula: meeting report. Food and Agriculture Organization. Rome, Italy. 2006b.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **HACCP Guidelines**. 2001. Disponível em <<http://www.foodsafety.gov/~dms/fc01-a5.html>>. Acesso em 18 jan. 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables**. 2008. Disponível em < [www.cfsan.fda.gov/~mow/pprodgui.html](http://www.cfsan.fda.gov/~mow/pprodgui.html)>. Acesso em 23 jan. 2009.

FOSTER, J. W. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.170-174, 1999.

FOSTER, J. W. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella Typhimurium*. **Critical Reviews Microbiology**, v.21, p. 215-237, 1995.

FRANZ, E. et al. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in manure-amended soil and lettuce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6165-6174, 2005.

FRIEDMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 1-10, 2007.

FU, B.; LABUZA, T. P. Shelf-life prediction: theory and application. **Food Control**, v.4, p. 125-133, 1993.

FUENTES, F. A. et al. *Klebsiella pneumoniae* in orange juice concentrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p. 1527-1529, 1985.

GEERAERD, A. H.; HERREMANS, C. H.; VAN IMPE, J. F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 185-209, 2000.

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

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

GORDEN, J.; SMALL, P. L. C. Acid resistance in enteric bacteria. **Infection and Immunity**, v. 61, p.364-367, 1993.

GOSNEY, M. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. **Age and Ageing**, v. 37, p. 236-237, 2008.

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

GREENBERG, A. E.; CLESCERI, L. S.; EATON, A. D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18. ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

GUAN, D. et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 under isothermal-endpoint pressure conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 620-627, 2006.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Influence of surfactant hydrophobicity on the detachment of *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 145-152, 2003.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p.103-109, 2004.

HELDMAN, D. R.; NEWSOME, R. L. Kinetic models for microbial survival during processing. **Food Technology**, v. 57, n. 8, p. 40-46, 2003.

HELMANN, J. D.; CHAMBERLAIN, M. J. Structure and function of bacterial sigma factors. **Annual Review of Biochemistry**, v.57, p.839-872, 1988.

HOLDSWORTH, S. D. Optimising the safety and quality of thermally processed packaged foods. In: RICHARDSON, P. (Ed.) **Improving the thermal processing of foods**. Boca Raton, FL: CRC Press LLC, 2004. p. 3-27.

HOORNSTRA, E. et al. The use of quantitative risk assessment in HACCP. **Food Control**, v.12, p.229-234, 2001.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. **Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce**. Washington, D. C: Food and Drug Administration, 2001. Disponível em <[http://www.cfsan.fda.gov/\\_comm/ift3-toc.html](http://www.cfsan.fda.gov/_comm/ift3-toc.html)> Acesso em: 18 jan. 2009.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1075-86, 1998.



INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **El sistema de analisis de riesgos y puntos criticos**. Zaragoza: Acribia, 1991, p.77-109.

IVERSEN, C. et al. *Cronobacter* gen. Nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. Nov. *C. malonaticus* sp. nov., *C. turisesnsis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *C. dublinensis* sp. nov subsp *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1442-1447, 2008.

JANES, M. E. et al. Sodium chloride and sodium bicarbonate washing solution for removal of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from the surface of chopped lettuce. **International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians**, p. 48-49, 1999.

JAY, J. **Modern Food Microbiology**. 6 ed. Maryland: Aspen, 2000. 679 p.

KAGAWA, Y. **Standard tables of food consumption in Japan**. 5. Ed. Tokyo: Kagawa Nutrition University Publishing Division, 2004.

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

KANDHAL, M. C. et al. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. **The Lancet**, v, 363, p. 39-40, 2004.

KARAPINAR, M.; GONUL, S. A. Removal of *Yersinia enterocolitica* from fresh parsley by washing with acetic acid or vinegar. **International Journal of Food Microbiology**, v.16, p. 261-264, 1992a.

KARAPINAR, M.; GONUL, S. A. Effects of sodium bicarbonate, vinegar, acetic and citric acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16, p.343-347, 1992b.

KIM, H.; RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Survival os *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 134-143, 2006.

KORNACKI, J. L.; JOHSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, P. F.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. Ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 69-82.

KOSEKI, S.; ISOBE, S. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 239-248, 2005a.

KOSEKI, S.; ISOBE, S. Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 217-225, 2005b.

KOSEKI, S.; ITOH, K. Prediction of microbial growth in fresh cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature conditions. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 12, p. 1935-1942, 2001.

LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults - case reports and a review of the literature. **Medicine**, v. 80, p. 113-122, 2001.

LECLERCQ, A.; WANEGUE, C.; BAYLAC, P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1631-1638, 2002.

LEE, I. S. et al. The stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella Typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 17, p. 155-167, 1995.

LI, J.; MCLANDBOROUGH, L. A. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 185-193, 1999.

LI, Y. et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-type AmpC beta-lactamase resistance in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1317-1321, 2008.

LIM, Y. H. et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 151-155, 2003.

LITTLE, C. et al. Microbiological quality of retail imported unprepared whole lettuces: PHLS food working group study. **Journal of Food Protection**, v. 4, p. 325-328, 1999.

LUND, B. M. The microbiological safety of prepared salad vegetables. **Food Technology International Europe**, p. 196-200, 1993.

MCCARTHY, M. et al. Who is at risk and what do they know? Segmenting a population on their food safety knowledge. **Food Quality and Preference**, v. 18, p. 205-217, 2007.

MCCLURE, P. J.; COLE, M. B.; DAVIES, K. W. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 359-375, 1994.

MCKELLAR, R. C., LU, X. KNIGHT, K. P. Growth pH does not affect the initial physiological state parameter (p<sub>0</sub>) of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p.137-144, 2002.

MCMEEKIN, T. A. et al. **Predictive microbiology: theory and application**. Somerset, U.K.: John Wiley and Sons, 1993. 340 p.

MCMEEKIN, T. A. et al. Model for combined effect of temperature and salt concentration water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p. 543-550, 1987.

MCWATTERS, L. H. et al. Consumer acceptance of fresh-cut iceberg lettuce treated with 2% hydrogen peroxide and mild heat. **Journal of Food Protection**, v, 65, p.1221–1226, 2002.

MCWHORTER, C. G.; OUZTS, C. Leaf surface morphology of *Erythroxylum* and droplet spread. **Weed Science society of America**, v. 42, p. 18-26, 1993.

MEAD, P. S.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157: H7. **The Lancet**, v. 352, p. 1207-1212, 1998.

MEAD, P. S. et al. Food related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, n. 5, 1999. Disponível em <<http://www.cdc.gov.ncidod/eid/vol5n5/meadG.htm>> Acesso em: 15 jun. 2006.

MEDEIROS, D. C. et al. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 25. p. 433-436, 2007.

MERREL, D. S.; CAMILLI, A. Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.51-55, 2002.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 99-110, 1994.

MILES, D. W.; ROSS, T. Identifying and quantifying risks in food production chain. **Food Austrália**, v. 51, n. 7, p. 298-303, 1999.

MOMESSO, A. P. **Levantamento das temperaturas de distribuição de alimentos durante o período de serviço de bufê, em restaurantes self-service do município de São Paulo e pesquisa de agentes patogênicos e indicadores de higiene.** 2002. 77 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

MONTGOMERY, D. C. **Introduction to statistical quality control.** 4. ed. New York: John Wiley and Sons, 2001.

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

MULLANE, N. et al. *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. **Minerva Pediatrica**, v. 59, p. 137-148, 2007.

NAGAI, H. Obtenção de novos cultivares de alface resistentes ao mosaico e ao calor. **Revista de Olericultura**, v. 18, p. 14 -21, 1980.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. **Food Control**, v. 10, p. 117-143, 1999.

NAUTA, M. J. Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? **International journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 297-304, 2002.

NEUMEYER, K.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. Development of Pseudomonas predictor. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.52, p.120-122, 1997.

NEWTON, K. G.; HARRISON, J. C. L.; SMITH, K. M. Coliforms from hides and meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.199-200, 1977.

NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 371–401, 1994.

NGUZ, K. et al. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. **Food Control**, v. 16, p. 623-628, 2005.

NOTERMANS, S.; VAN DER GIESSEN, A. Foodborne diseases in the 1980s and 1990s: the Dutch experience. **Food Control**, v.4, p.122-124, 1993.

NOTERMANS, S. et al. A user's guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of foods products. **Food Microbiology**, v. 10, p. 145-157, 1993.

NOTERMANS, S.; ZWIETERING, M. H.; MEAD, G. C. The HACCP concept: identification of potentially hazardous micro-organisms. **Food microbiology**, v.11, p.203-214, 1994.

NOTERMANS, S. et al. The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assessment. **Food microbiology**, v.12, p.81-90, 1995.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Guias para la calidad del agua potable. Genebra. 1987.

ØRSKOV, I., ØRSKOV, F. Serotyping of *Klebsiella*. In: BERGAN, T. (Ed). **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, 1984. p.143-164.

PALMAI, M; BUCHANAN, R. L. Growth of *Listeria monocytogenes* during germination of alfafa sprouts. **Food Microbiology**, v. 19, p. 195-200, 2002.

PANISELLO, P. J. et al. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 221-234, 2000.

PARISH, M. E. et al. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p. 161-173, 2003.

PELEG, M. Modelling microbial populations with the original and modified versions of the continuous and discrete logistic equations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 5, p. 471-490, 1997.

PELEG, M.; COLE, M. B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 353-380, 1998.

PEÑA, W. E. L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã.** 2005. 360 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas,SP.

PEREIRA, S. C. L. **Caracterização molecular de fatores de virulência de *Klebsiella* sp. Isoladas de dietas enterais.** 2001. 123 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PFLUG, I. J. **Microbiology and Engineering of Sterilization Processes.** Environmental Sterilization Laboratory. 7. ed. Minneapolis, MN. 1990.

PRUITT, K. M.; KAMAU, D. N. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p. 221-231, 1993.

RATKOWSKY, D. A. et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v.149, p. 1-5, 1982.

RATKOSWSKY, D. A. et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, v.154, p.1222-1226, 1983.

RATKOSWSKY, D. A. Model fitting and uncertainty. In: MCKELLAR, R. C.; LU, X. (Ed.). **Modelling Microbial Responses in Foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 151-196.

REDIERS, H. et al. Hand hygiene in the food industry: resolving an enigma. **Food Protection Trends**, v. 28, p. 568-584, 2008.

RHEE, M. S. et al. Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2959-2963, 2003.

RICHARDS, G. M.; GURTLER, J. B.; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula or apple juice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, 844-850, 2005.

ROSE, J. B.; GERBA, C. P. Use of risk assessment for development of microbial standards. **Water Science and Technology**, v. 24, p. 29-34, 1991.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology: applications of a square root model. **Food Australia**, v.43, p.202-207, 1991.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 241-264, 1994.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal Applied Bacteriology**, v. 81, p.501-508, 1996.

ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 231-245, 2000.

ROWBURY, R. J., GOODSON, M., HUMPHREY, T., Sodium chloride induces an NhaA/NhaR-independent acid sensitivity at neutral external pH in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.5, p.1630-1634, 1994.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 247-254, 2005.

SABOTA, J. M.; HOPES, W. L.; ZIEGLER, J. R. A new variant of food poisoning: enteroinvasiva *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. **American Journal of Gastroenterology**, v. 93, p. 18-119, 1998.

SANTOS, R. H. S. Olericultura orgânica. In: FONTES, P. C. R. (Ed.). **Olericultura – teoria e prática**. 1 ed. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora. 2005.

SCHAFFNER, D. W.; LABUZA, T. P. Predictive Microbiology: where are we, and where are we going? **Food Technology**, v. 51, n. 4, p. 95-99, 1997.

SCHLUNDT, J. Principles of food safety risk management. **Food Control**, v.10, p. 299-302, 1999.

SCHOTHORST, M. V. Microbiological risk assessment of foods in international trade. **Safety science**, v. 40, p. 359-382, 2002.

SENGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella typhimurium* on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 319-323, 2005.

SEO, K. H.; FRANK, J. F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacteria viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 3-9, 1999.

SHARMA, M. M.; CHANG, Y.I.; YEN, T. F. Reversible and irreversible surface charge modification of bacteria for facilitating transport through porous media. **Colloids and Surfaces**, v. 16, p. 193-206, 1985.

SHEARER, A. E. H.; STRAPP, C. M.; JOERGER, R. D. Evaluation of polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 788-795, 2001.

SILVA, R. M. M. **Especificações microbiológicas para ambientes e manipuladores e equipamentos em restaurantes industriais**. 1996. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SILVA, F. C. et al. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 831-840, 2001.

SILVA, C. H. P. M.; NETTO, H. T. Presença de coliformes em mãos e unhas de manipuladores de alimentos no município de Vitória-ES. In: I Congresso Latino-Americano de Higienistas de Alimentos e VII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2003. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n.104, 2003.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação**. 6. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 623 p.

SIVAPALASINGAM, S.; FRIEDMAN, C. R.; COHEN, L.; TAUXE, R. V. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2342-2353, 2004.

SKINNER, E. G.; LERKIN, J. W. Mathematical modelling of bacterial growth: a review. **Journal of Food Safety**, v.14, p.175-217, 1994.

SPERBER, W. H. Hazard identification: from a quantitative to a qualitative approach. **Food Control**, v.12, p. 223-228, 2001.

SOLOMON, E. B.; BRANDL, M. T.; MANDRELL, R. E. Biology of foodborne pathogens on produce. In: MATTHEW, K. R. **Emerging issues in food safety. Microbiology of fresh produce**. Washington D.C: ASM Press, 2006. p. 55-48.

SORIANO, J. M. et al. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p.123-128, 2000.

SORIANO, J. M. et al. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and spanish potato omelette from restaurants. **Food Microbiology**, v. 18, p. 159-163, 2001.

SPERBER, W. H. Hazard identification: from a quantitative to a qualitative approach. **Food Control**, v.12, p. 223-228, 2001.

STILES, M. E.; NG, L. K. *Enterobacteriaceae* associated with meats and meat handling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, 867-872, 1981.

SUDAKEVITZ, D. et al. A new *Ralstonia solanacearum* high-affinity mannose-binding lectin RS-IIL structurally resembling the *Pseudomonas aeruginosa* fucose-specific lectin PA-IIL. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 691-700, 2004.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 137-159, 2004.

TAKEUCHI, K. et al. Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1433-1437, 2000.



TAKEUCHI, K.; FRANK, J. F. Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157: H7 from chlorine disinfection. **Journal of Food Protection**, v. 64, p.147-151, 2001.

TETTEH, G. L; BEUCHAT, L. R. Exposure of *Shigella flexneri* to acid stress and heat shock enhances acid tolerance. **Food Microbiology**, v. 20, p. 179-185, 2003a.

TETTEH, G. L; BEUCHAT, L. R. Survival, growth, and inactivation of acid-stressed *Shigella flexneri* as affected by pH and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p.131-138, 2003b.

TODD, E. C. P. Foodborne and waterborne diseases in Canada. Annual summaries, 1985 and 1986. Foodborne Disease Reporting Centre, Bureau of Microbiological Hazards, Ottawa, Ontario. 1991.

TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. 2. ed. Orlando: Academic Press, 1993.

TSUJIHATA, S. et al. Mathematical modelling to predict the bactericidal effect of processed vinegar on *Escherichia coli* O157: H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p.135-138, 1998.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. On the use of Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 139-159, 2002.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.97-105, 2005.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 83-88, 2005.

VIGGIANO, J. Produção de sementes de alface. In: CASTELLANE, P. D.; NICOLOSI, W. M.; HASEGAWA, M. (Ed.). **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/FUNEP, 1990, p.1-13.

VIJAYAKUMAR, C.; WOLF-HALL, C. E. Minimum bacteriostatic and bactericidal concentrations of household sanitizers for *Escherichia coli* strains in tryptic soy broth. **Food Microbiology**, v. 19, p. 383-388, 2002.

VIRTO, R. et al. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 251-257, 2005.

WACHTEL, M. R.; CHARKOWSKI, A. O. Cross-contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 465-470, 2002.

WATERMAN, S. R.; SMALL, P. L. C. Identification of  $\sigma^S$ -dependent genes associated with the stationary phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. **Molecular Microbiology**, v.21, p.925-940, 1996.

WEISSINGER, W. R. et al. Survival and growth of *Salmonella bairdii* in shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 123-131, 2000.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. New York: Oxford University Press, 2000. 565p.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. Predictive modelling In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 728-739.

WONG, H. C, WANG, P. Induction of viable but non-culturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p.359-366, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of a consultation group on obesity. **Preventing and managing the global epidemic**. Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. The world health report. Primary health care. Now more than ever. Geneva. 2008.

WRIGHT, J. R. et al. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on apples using wash and chemical sanitizer treatments. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 20, p.120-126, 2000.

WU, F. M. et al. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. **Journal of Food Protection**, v. 63, p.468-572, 2000.

ZHANG, S.; FARBER, J. M. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, v. 13, p. 311-321, 1996.

ZHANG, P.; PENNER, K. Prevalence of selected unsafe food-consumption practices and their associated factors in Kansas. **Journal of Food Safety**, v. 19, p. 289-297, 1999.

ZHUANG, R. Y.; BEUCHAT, L. R.; ANGULO, F. J. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p.2127-2131, 1995.

ZWIETERING, M. H. et al. Modelling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875-1881, 1990.

ANEXO 1 - Análises estatísticas do teste de suspensão realizado para determinar as reduções decimais de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* após exposição a soluções de vinagre acrescentadas ou não de cloreto de sódio.

Tabela 19 - ANOVA das reduções decimais nas populações de *Escherichia coli* após tratamentos com soluções de ácido acético e cloreto e sódio.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P-Valor
Tratamentos	0,338	5	0,0676	1,71	0,2204 <sup>ns</sup>
Blocos	0,401	2	0,2010		
Resíduo	0,396	10	0,0396		
TOTAL	1,140	17			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; ns = não significativo.

Tabela 20 - ANOVA das médias das contagens da população de *Cronobacter sakazakii* sobrevivente aos seis tratamentos.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P-Valor
Tratamentos	2,930	5	0,585	17,72	0,0001*
Blocos	0,378	2	0,189		
Resíduo	0,330	10	0,033		
TOTAL	3,638	17			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; \* = significativo ao nível de 0,1% (P < 0,001).

Tabela 21 - Teste de Tukey para os tratamentos *Cronobacter sakazakii*.

Tratamentos	Repetições	Médias	Grupos homogêneos
T 1	3	1,85423	A
T 2	3	1,68307	AB
T 3	3	1,22720	BC
T 4	3	0,96110	C
T 6	3	0,85850	C
T 5	3	0,81723	C

OBS.: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (P>0,05).

Tabela 22 - ANOVA para experimento de *Klebsiella pneumoniae*.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P-Valor</b>
Tratamento	3,740	5	0,748	3,63	0,0394*
Blocos	0,056	2	0,028		
Resíduo	2,060	10	0,206		
<b>TOTAL</b>	<b>5,856</b>	<b>17</b>			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; \* = significativo ao nível de 1% ( $P < 0,01$ ).

Tabela 23 - Teste de Tukey para os tratamentos *Klebsiella pneumoniae*.

<b>Tratamentos</b>	<b>Repetições</b>	<b>Médias</b>	<b>Grupos homogêneos</b>
T 2	3	1,73317	A
T 1	3	1,48663	AB
T 3	3	0,73577	BC
T 6	3	0,70530	BC
T 5	3	0,67303	BC
T 4	3	0,54057	C

OBS.: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ ).

ANEXO 2 - Análises estatísticas do teste da adesão de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* em alface tratadas com água, cloramina orgânica, ácido acético 1,5% e ácido e acético 1,5% e cloreto de sódio 0,5%.

Tabela 24 - ANOVA das reduções decimais das populações de *Escherichia coli* após os tratamentos.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P-Valor
Tratamentos	0,820515	3	0,273505	7,81	0,0171*
Blocos	0,082024	2	0,0410118		
Resíduo	0,210208	6	0,0350346		
TOTAL	1,11275	11			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; \* = significativo ao nível de 5% ( $P < 0,05$ ).

Tabela 25 - Teste de Tukey para os tratamentos *Escherichia coli*.

Tratamentos	Repetições	Médias	Grupos homogêneos
T 1	3	1,10839	A
T 3	3	1,15096	A
T 4	3	1,28422	AB
T 2	3	1,76620	B

OBS.: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ ).

Tabela 26 - ANOVA para experimento de *Cronobacter sakazakii*.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P-Valor
Tratamentos	1,99685	3	0,665617	7,64	0,0179*
Blocos	0,471485	2	0,235742		
Resíduo	0,522407	6	0,0870679		
TOTAL	2,99074	11			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; \* = significativo ao nível de 5% ( $P < 0,05$ ).

Tabela 27 - Teste de Tukey para os tratamentos *Cronobacter sakazakii*.

<b>Tratamentos</b>	<b>Repetições</b>	<b>Médias</b>	<b>Grupos homogêneos</b>
T 1	3	0,94156	A
T 3	3	1,25182	AB
T 4	3	1,86553	B
T 2	3	1,89875	B

OBS.: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ ).

Tabela 28 - ANOVA para experimento de *Klebsiella pneumoniae*.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P-Valor</b>
Tratamentos	3,51787	3	1,17262	9,87	0,0098*
Blocos	0,07169	2	0,03585		
Resíduo	0,71291	6	0,11882		
TOTAL	4,30247	11			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; \* = significativo ao nível de 1% ( $P < 0,01$ ).

Tabela 29 - Reduções decimais após os tratamentos das folhas de alface artificialmente com *Klebsiella pneumoniae*.

<b>Tratamentos</b>	<b>Repetições</b>	<b>Médias</b>	<b>Grupos homogêneos</b>
T 1	3	0,57964	A
T 3	3	1,52870	AB
T 4	3	1,85812	B
T 2	3	1,94544	B

OBS.: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ ).

Anexo 3 - Análises estatísticas sobre a avaliação da resistência das enterobactérias *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* aderidas à folha de alface em relação aos tratamentos com água, cloramina orgânica, ácido acético 1,5% e ácido e acético 1,5% e cloreto de sódio 0,5%.

Tabela 30 - ANOVA das reduções decimais das populações de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* após tratamento com água.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P-Valor
A:Bactérias	0,438401	2	0,219201	4,25	0,1025 <sup>ns</sup>
B:Repetições	0,008845	2	0,004422		
Resíduo	0,206528	4	0,051632		
TOTAL	0,653774	8			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; ns= não significativo ao nível de 5% ( $P < 0,05$ ).

Tabela 31 - ANOVA das reduções decimais das populações de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* após tratamento com cloramina orgânica.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P-Valor
A:Bactérias	0,051880	2	0,025940	0,32	0,7406 <sup>ns</sup>
B:Repetições	0,008141	2	0,004071		
RESIDUAL	0,320170	4	0,080043		
TOTAL	0,380191	8			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; ns = não significativo ao nível de 5% ( $P < 0,05$ ).

Tabela 32 - ANOVA das reduções decimais das populações de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* pela ação do ácido acético 1,5%.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P-Valor
A:Bactérias	0,229524	2	0,114762	0,52	0,6307 <sup>ns</sup>
B:Repetições	0,086289	2	0,043144		
RESIDUAL	0,885598	4	0,221399		
TOTAL	1,201410	8			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; ns= não significativo ao nível de 5% ( $P < 0,05$ ).



Tabela 33 - ANOVA das reduções decimais das populações de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae* pela ação do ácido acético 1,5% e cloreto de sódio 0,5%.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P-Valor</b>
A:Bactérias	0,667336	2	0,333668	2,55	0,1935 <sup>ns</sup>
B:Repetições	0,031104	2	0,015552		
RESIDUAL	0,524053	4	0,131013		
<b>TOTAL</b>	<b>1,222490</b>	<b>8</b>			

SQ = quadrado médio; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro; F = valor F de Fisher; P-Valor = valor de probabilidade; ns = não significativo.

# 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](#)