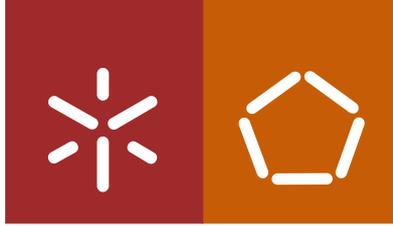


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Catarina Ramos Pereira

Estudo da aplicação da citometria de fluxo (D-count®) na avaliação higiénica de superfícies e na pesquisa de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Catarina Ramos Pereira

**Estudo da aplicação da citometria de
fluxo (D-count®) na avaliação higiénica
de superfícies e na pesquisa de *Bacillus cereus*
e *Escherichia coli***

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do
Doutor Armando Albino Dias Venâncio
e da
Engenheira Regina Brito

outubro de 2014

Nome: Catarina Ramos Pereira

N.º do Cartão de Cidadão/BI: 14024613 Telefone/Telemóvel: 916914650

Correio eletrónico: catarina.ramos.p@gmail.com

Curso: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica Ano de conclusão da dissertação: 2014

Área de Especialização: Tecnologia Química e Alimentar

Escola de Engenharia, Departamento/Centro: Engenharia Biológica

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO/TRABALHO DE PROJETO

Título em PT: Estudo da aplicação da citometria de fluxo (D-count®) na avaliação higiénica de superfícies e na pesquisa de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*

Título em EN: Study of flow cytometry's application (D-count®) in surfaces's hygiene evaluation and search of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*

Orientador: Professor Doutor Armando Albino Dias Venâncio

Coorientador: Engenheira Regina Brito

Número de Unidades ECTS da Dissertação: 30 Classificação em valores (0 a 20): 18

Classificação ECTS com base no percentil (A a F): _____

Declaro sob compromisso de honra que a dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Universidade do Minho, UM.

Declaro que concedo à Universidade do Minho e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha dissertação, em suporte digital.

Concordo que a minha dissertação seja colocada no repositório da Universidade do Minho com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do trabalho para acesso universal;
- Disponibilização do trabalho para acesso exclusivo na UM, durante o período de 1 ano, 2 anos ou 3 anos, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso universal.
- Disponibilização do trabalho de acordo com o **Despacho RT-98/2010 c)** (embargo # anos)

Braga, 10 de Dezembro de 2014

Assinatura:

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho só foi possível com a ajuda e incentivo de algumas pessoas, as quais desde já deixo o meu obrigado.

Ao meu orientador, Doutor Armando Albino Dias Venâncio, pela disponibilidade, por todo o apoio e interesse em ouvir a evolução do meu trabalho e pelo esclarecimento de todas as dúvidas e dificuldades que foram aparecendo.

À Engenheira Regina Brito, pela oportunidade de realização deste trabalho, pelas orientações, disponibilidade, compreensão e por todos os comentários e sugestões propostos ao longo do meu estágio na Lactogal. Obrigado por ter acompanhado a evolução do meu trabalho e por todos os ensinamentos transmitidos.

À Doutora Maria José da bioMérieux pela simpatia e pela disponibilidade para me ajudar nos temas abordados e relativos ao D-count®.

A todas as pessoas que trabalham no laboratório da Lactogal, que sempre se mostraram disponíveis para me acompanhar ao longo do estágio. Em especial quero agradecer a ajuda da Sofia, da Isilda, da Fátima Santos, da Cristina, da Clotilde e da Maria José. Obrigado, a todas, por toda a amizade e apoio.

A todos os meus amigos que sempre me incentivaram e ajudaram a superar todos os obstáculos ao longo do tempo e, claro, por todo o carinho e dedicação que demonstraram. Em especial quero agradecer à Natália e à Sara, que apesar da distância, sempre estiveram presentes em todos os momentos.

A todos os que fizeram parte desde percurso académico um muito obrigado por estes cinco anos maravilhosos. Quero agradecer especialmente pela amizade, apoio, companheirismo e por permitirem que tudo isto fosse possível. Obrigada minha *Gold Family!*

Ao meu Querido, pela cumplicidade, afeto e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Pela compreensão, apoio e incentivo nos momentos mais complicados e, o mais importante, por me ajudar na realização dos meus sonhos. Por tudo, o meu especial obrigado!

A toda a minha família, especialmente à minha Mãe, ao meu Pai e ao meu Irmão por toda a dedicação e apoio. Um muito obrigado por terem estado sempre ao meu lado, acompanharem de perto este meu percurso académico e por sempre acreditarem em mim. Sem eles, isto nunca seria possível. Espero nunca vos desiludir e de alguma forma conseguir retribuir todo o carinho e dedicação que sempre me ofereceram.

A todos, muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

Resumo

Hoje em dia as exigências dos consumidores em relação aos produtos que consomem têm vindo a aumentar, por isso mesmo, a indústria dos laticínios, compromete-se a oferecer produtos com qualidade. Visto que as alterações normalmente observadas no leite são devido à atividade microbiana, um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da qualidade do leite, é a contagem de microrganismos, que pode ser realizada pela contagem padrão em placas. Apesar de este método ser um método muito simples, é muito moroso, por isso mesmo as empresas começam a apostar em métodos mais automatizados e com resultados mais rápidos, como por exemplo a citometria de fluxo.

Com o presente trabalho pretendeu-se potenciar a aplicabilidade do equipamento D-Count®, que já tinha sido adquirido pela Lactogal para a avaliação da qualidade do leite. O trabalho foi dividido em três partes onde em cada parte foi avaliada uma diferente aplicação para o equipamento. Na primeira parte, o objetivo era o estudo da aplicação do D-Count® na avaliação da higiene de superfícies, onde foram analisadas varias superfícies pelo D-Count® e em paralelo pelo método de referência e verificou-se a correlação entre os dois métodos. O coeficiente de correlação estimado foi de 0,92 e em média, as contagens pelo D-Count® foram 3,55 vezes maiores do que na contagem padrão em placa. Na segunda parte do presente trabalho, avaliou-se a aplicação do D-Count® na quantificação de microrganismos termorresistentes, como o *Bacillus cereus*. O coeficiente de correlação entre o método de referência e o equipamento D-Count® foi elevado (0,9039 e 0,9899) e os valores do D-count® foram cerca de 10 vezes mais baixos do que os valores obtidos pela contagem padrão em placa. A última parte, focou-se na aplicação do D-Count® na quantificação de *Escherichia coli*, onde mais uma vez se verificou a correlação entre o método de referência e o equipamento D-Count®. Além disso, foi analisada a curva de crescimento da *Escherichia coli* de modo a perceber qual o tempo mínimo de incubação para a deteção deste microrganismo no leite. O coeficiente de correlação estimado entre os dois métodos foi de 0,9968 e em média, as contagens pelo D-Count® foram 3,31 vezes maiores do que na contagem padrão em placa. Quanto ao tempo de incubação, do leite, necessário para a deteção deste microrganismo, pelo D-Count®, deve ser de 4 h.

Em conclusão, é possível afirmar que o D-Count® pode ser utilizado como um método alternativo à contagem padrão em placa, para a avaliação higiénica de superfícies e para a quantificação de *Escherichia coli*. No caso do *Bacillus cereus*, o D-Count® funciona como um método mais qualitativo do que quantitativo.

Abstract

Nowadays, there is an increase on consumer demands about the products they buy, therefore dairy industry is committed to offering quality products. Knowing that microbiological activity is responsible for the changes observed in milk, one of the most important parameters to evaluate the quality of milk is microorganisms counting, that can be performed by standard plate count. Despite being a simple method, it takes a lot of time, so companies are starting to use automated methods with faster results, including flow cytometry.

The objective of this project was to enhance the applications of the equipment D-Count®, that had been already acquired by Lactogal, to evaluate the quality of milk. This project had three parts, in which a different application of the equipment was assessed. In the first part we studied its application in the surfaces hygiene evaluation, analyzing several surfaces with D-Count® and the gold standard method. Correlation coefficient was 0,92 and D-Count® counts were in average 3,55 times higher than counts using the gold standard method. In the second part we analyzed D-Count® application on quantification of heat resistant microorganisms, like *Bacillus cereus*. Correlation coefficient between the gold standard and D-Count® was (0,9039 and 0,9899) and D-Count® values were nearly 10 times lower than those obtained by the classical method. In the last part of the project we assessed the application of D-Count® in *Escherichia coli* quantification, assessing the correlation between D-Count® and the gold standard method. Moreover we analyzed the growth curve of this microorganism, to estimate which was the minimum incubation time to detect *Escherichia coli* on milk samples. Correlation coefficient was 0,9968 and D-Count® counts were in average 3,31 times higher than counts using the gold standard. Using D-Count® we found that we needed 4 hours to detect *E. coli*.

In conclusion, D-Count® can be used as an alternative method for surfaces hygiene evaluation and for *Escherichia coli* quantification. Concerning *Bacillus cereus* quantification, D-Count® can be used as an qualitative method.

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	ix
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
I- Introdução	1
1. Enquadramento geral.....	3
1.1. Empresa - Lactogal, Produtos Alimentares S.A.	3
1.2. Motivações e objetivos.....	4
2. O leite.....	6
2.1. Composição do leite	6
2.2. Processo de produção de leite.....	8
3. Qualidade microbiológica do leite	12
3.1. Principais fontes de contaminação.....	13
3.1.1. Microrganismos que contaminam o leite	14
3.1.1.1. <i>Bacillus Cereus</i>	17
3.1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	19
3.2. Crescimento microbiano.....	20
3.3. Importância da higienização das superfícies.....	23
4. Viabilidade Celular	26
5. Técnicas de contagem de microrganismos	27
5.1. Método de referência.....	27
5.2. Citometria de Fluxo	28
5.3. Diferença de custos de análise dos dois métodos.....	32

II- Materiais e Metodologias	33
1. Aplicação da citometria de fluxo na avaliação higiénica de superficies	35
1.1. Método por zaragatoa.....	35
1.2. Diluições	35
1.3. Citometria de Fluxo – D-Count®.....	36
1.4. Contagem em Placa	38
2. Aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de <i>Bacillus cereus</i>	39
2.1. Preparação da amostra	39
2.2. Citometria de Fluxo – D-Count®.....	40
2.3. Contagem em Placa	42
3. Aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	43
III- Resultados e Discussão	45
1. Aplicação da citometria de fluxo na avaliação higiénica de superficies	47
2. Aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de <i>Bacillus Cereus</i>	51
3. Aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	58
IV- Conclusões e Perspetivas de Trabalho.....	65
1. Principais Conclusões	67
2. Perspetivas de Trabalho	68
Referências Bibliográficas	69

Lista de Siglas e Abreviaturas

Variáveis e Constantes

A	Área da superfície estudada
a_w	Atividade da água
D	Inverso da diluição utilizada
F	Quantidade de solução de diluição
N^o	Número
N	Concentração ou densidade populacional
N_0	Concentração ou densidade populacional inicial
N_t	Concentração ou densidade populacional no tempo t
N_v	Número de unidades formadoras de colónias ou contagem individual de bactérias por mL de solução de diluição
N_s	Número de unidades formadoras de colónias ou contagem individual de bactérias por cm ² da área estudada
R	Coeficiente de correlação
T	Tempo
t_0	Tempo inicial
t_g	Tempo de geração / Tempo de duplicação da população
T	Temperatura
μ	Taxa específica de crescimento
μ_{max}	Taxa específica de crescimento máxima

Siglas

ATP	Adenosina trifosfato
CIB	Contagem individual de bactérias
CPP	Contagem padrão em placa
EHEC	<i>E. coli enterohemorrágicas</i>
EIEC	<i>E. coli enteroinvasivas</i>
EPEC	<i>E. coli enteropatogénicas</i>
ETEC	<i>E. coli enterotoxigénicas</i>
ETEI	Estação de tratamento de efluentes industriais
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
LPS	Lipopolissacarideo
MPCA	<i>Milk Plate Count Agar</i>
UFC	Unidades formadoras de colónias
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
VNC	Viável mas não cultivável
VRBA	<i>Violet Red Bile Agar</i>

Índice de Figuras

Figura 1 - Lactogal Modiva	3
Figura 2 - Composição quantitativa do leite	6
Figura 3- Processo de produção do leite	8
Figura 4- Centrífuga	10
Figura 5 - Máquina de enchimento Tetra Pak	11
Figura 6 - Camadas das embalagens Tetra Pak	11
Figura 7 - Curva de crescimento bacteriano em sistema fechado	22
Figura 8 - Placas contaminadas	27
Figura 9 - D-Count®	29
Figura 10 - Marcação dos microrganismos	30
Figura 11 – Sistema de deteção das células marcadas	30
Figura 13 - Componentes do equipamento D-Count®	36
Figura 12 - Diluições sucessivas	36
Figura 14 - Unidade de preparação de amostras(protocolo para águas)	37
Figura 15 - Unidade de preparação de amostras(protocolo para leite estéril)	41
Figura 16 - Correlação entre a contagem microbiana total obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa	48
Figura 17 - Correlação entre a contagem microbiana total, da água da torneira, obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa	50
Figura 18 - Correlação entre a contagem microbiana total, das diferentes amostras, obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa	51
Figura 19 - Correlação entre a contagem microbiana total obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa na quantificação de <i>Bacillus cereus</i>	55

Figura 20 – Diferença entre as contagens microbianas totais obtidas pelo método de contagem padrão em placa com meio MPCA e as contagens de coliformes obtidas pelo método de contagem padrão em placa com meio VRBA.	58
Figura 21 - Correlação entre a contagem microbiana total obtida pelo método de contagem padrão em placa com meio MPCA e a contagem de coliformes obtida pelo método de contagem padrão em placa com meio VRBA.	59
Figura 22 - Curva de crescimento da <i>Escheriachia coli</i>	60
Figura 23 - Correlação entre a contagem microbiana total obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa	63

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais microrganismos frequentes nos laticínios.....	15
Tabela 2 – Exemplo comparativo dos gastos num ano do D-Count® e da contagem padrão em placa	32
Tabela 3 - Limites estabelecidos pela Lactogal	50
Tabela 4 - Média das contagens do D-Count® e das contagens em placa das diferentes amostras, fornecidas pela CecaLait, e respetivos valores de referência.	52
Tabela 5 - Contagens do D-Count® e contagens em placa, com respetivas médias, das amostras contaminadas com <i>Bacillus cereus</i>	53
Tabela 6 - Resultados das contagens do D-Count® e das contagens em placa da amostra 2, fornecida pela CecaLait.....	54
Tabela 7 - Valores da taxa específica de crescimento e do tempo de duplicação da população .	62

I- Introdução

Neste capítulo faz-se, inicialmente, um enquadramento geral do trabalho onde se descreve de uma forma geral a empresa na qual foi realizado o presente trabalho. Refere-se as motivações para a sua realização e os principais objetivos.

Inclui-se também vários subcapítulos onde são abordados diversos tópicos acerca do leite tais como a sua composição e o processo de produção de leite UHT.

Outro subcapítulo foca-se na qualidade microbiológica do leite, onde são referidas as principais fontes de contaminação e são caracterizados os microrganismos de maior importância para este trabalho (*Bacillus cereus* e *Escherichia coli*), além disso é feita uma referência ao crescimento microbiano e à importância da higienização das superfícies.

Por último, dedica-se um subcapítulo sobre a citometria de fluxo e a contagem padrão em placa, onde se referem as suas principais características e as vantagens e desvantagens de cada um dos métodos.

1. Enquadramento geral

1.1. Empresa - Lactogal, Produtos Alimentares S.A.

A Lactogal (figura 1), Produtos Alimentares S.A., é uma empresa agro-alimentar portuguesa especializada em lacticínios e seus derivados. Foi fundada em 1996 pela AGROS - União das Cooperativas de Produtores de Leite de Entre Douro e Minho e Trás-os-Montes, UCRL, a LACTICOOP - União das Cooperativas de Produtores de Leite entre Douro e Mondego, UCRL, e a PROLEITE/MIMOSA S.A. e tem como objetivo produzir e comercializar, nos mercados nacional e internacional, lacticínios e outros bens alimentares.

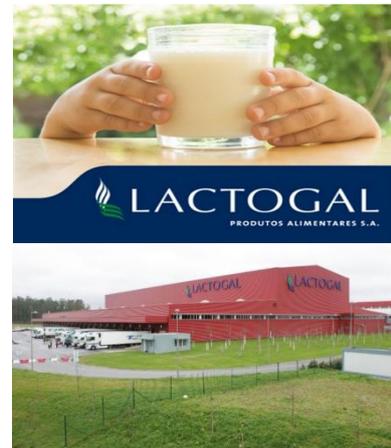


Figura 1 - Lactogal Modivas (reproduzido de Lactogal, 2014)

A Lactogal é composta, em Portugal, por 3 unidades industriais, quatro plataformas logísticas e oito delegações comerciais. O leque de produtos Lactogal tem vindo a crescer, sendo constituído por leite, iogurtes, queijos, manteigas, natas, águas e sumos. As marcas propriedade da Lactogal são: Agros, Mimosa, Gresso, Adagio, Matinal, Castelões, Castelinhos, Serra Dourada, Vigor, Pleno, Primor, Serra da Penha, Fresky e Milhafre dos Açores.

A empresa assume um papel fundamental na valorização da produção do leite nacional, produz produtos pensados numa alimentação equilibrada e além do mais garante a qualidade de todos os produtos que coloca no mercado. Esta qualidade permite-lhe assegurar uma liderança tecnológica e comercial decorrente da capacidade de satisfazer de modo superior as necessidades e expectativas dos seus clientes e dos seus consumidores.

Além disso, a Lactogal assume o compromisso de desenvolvimento sustentável na sua atividade, fazendo parte das suas preocupações o consumo de recursos naturais e de energia elétrica, o tratamento e a reutilização de águas residuais, a diminuição de produção de resíduos e o aumento da reciclagem.

O trabalho que realizei decorreu na unidade industrial de Modivas – Vila do Conde, que produz 1.5 milhões de litros de leite UHT (*Ultra High Temperature*), por dia, sendo leite simples, leite com chocolate e natas UHT.

Esta unidade industrial foi projetada de modo a satisfazer as necessidades dos consumidores e de modo a respeitar todas as normas de qualidade e higiene, assim, é possível encontrar tecnologia de ponta de elevada automatização.

Além disso, a unidade industrial de Modivas foi concebida de modo a satisfazer todos os requisitos ambientais. Para isso, nas suas instalações possui uma estação de tratamento de efluentes industriais (ETEI).

1.2. Motivações e objetivos

A sociedade atual é caracterizada pela falta de tempo e por uma má alimentação o que leva a um maior risco de ocorrência de desequilíbrios nutricionais.

O leite é um alimento que se integra facilmente na alimentação diária e que está presente na vida humana desde o nascimento. Apresenta-se em diversas formas pelos seus derivados, é essencial em todas as fases da vida, tendo uma incomparável riqueza nutricional (fonte de proteínas, vitaminas, minerais como o cálcio e outros nutrientes). Assim sendo, é possível dizer que mantem-se viva a conclusão de Hipócrates: “Leite é um alimento muito próximo da perfeição”.

No entanto, é um alimento facilmente perecível que pode alterar-se com muita facilidade. Assim, é necessário proteger o leite de contaminações para que o seu valor nutritivo não seja alterado.

Hoje em dia as exigências dos consumidores em relação aos produtos que consomem têm vindo a aumentar, por isso, de modo a satisfazer estas exigências, a Lactogal compromete-se a oferecer produtos com qualidade, ou seja, produtos que sejam seguros e adequados tanto do ponto de vista nutricional quanto sanitário.

A qualidade microbiológica é um dos aspetos mais importantes na avaliação do leite, sendo que as contaminações por microrganismos podem ocorrer durante a ordenha, transporte e armazenamento do leite cru ou então durante o processamento deste. Assim sendo, a Lactogal, de forma a garantir e manter a qualidade do leite, monitoriza constantemente a qualidade do leite cru recebido, desenvolveu um processo de produção capaz de destruir na

totalidade ou grande parte da flora microbiana presente no leite cru, garante a higienização ao longo de todo o processamento do leite e monitoriza o produto final embalado.

De modo a verificar a qualidade do leite, a empresa avalia determinados parâmetros tais como: características sensoriais como sabor e odor, contagem de microrganismos, pH, acidez total, índice crioscópico, densidade, matéria gorda, matéria proteica, lactose e extrato seco.

Visto que as alterações normalmente observadas no leite são devido à atividade microbiana, um dos parâmetros mais importantes é a contagem de microrganismos, que pode ser realizada por dois métodos diferentes: contagem padrão em placas (método de referência) ou citometria de fluxo. O método de referência é um método simples no entanto muito moroso, enquanto, a citometria de fluxo é um método mais expedito e automatizado.

Apesar da Lactogal apenas aplicar a citometria de fluxo como uma técnica para a avaliação da qualidade do leite UHT, ainda não é aplicada para a avaliação da higienização de superfícies ou para a quantificação de microrganismos termorresistentes, como o *Bacillus cereus* ou para a quantificação de *Escherichia coli*. Assim, considerou-se revelante o estudo da utilização deste método, uma vez que, comparado com o método de referência é muito mais rápido, fornecendo assim os resultados no imediato.

Torna-se assim, objetivo desde trabalho o estudo da aplicação da citometria de fluxo na avaliação higiénica de superfícies, na pesquisa de *Bacillus cereus* e na pesquisa de *Escherichia coli*.

2. O leite

A história do leite e produtos lácteos está ligada à história do homem e remonta aos tempos mais remotos, desde que este começou a domesticar e criar animais. O leite é um alimento produzido por todos os mamíferos e surge como um alimento indispensável para um bom desenvolvimento dos mesmos. Normalmente quando se refere ao leite pensa-se imediatamente no leite mais comum, o de vaca. Contudo existem diversos tipos de leite, com sabores e composições ligeiramente diferentes. Assim, o leite pode ser definido como um produto biológico secretado nas glândulas mamárias e obtido pela ordenha de mamíferos.

O leite sempre foi utilizado como alimento e hoje em dia está presente na alimentação principalmente em diversas formas pelos seus produtos derivados como iogurtes, queijos, etc... Este deve apresentar uma cor amarelada, sabor levemente adocicado e odor suave, opaco, líquido, homogêneo e sem substâncias estranhas. Com o desenvolvimento da indústria dos laticínios, desenvolveram-se diferentes tipos de leite, com características nutricionais distintas, visando responder a diferentes necessidades alimentares.

2.1. Composição do leite

Um alimento que fornece ao homem macro e micro nutrientes indispensáveis ao crescimento, bem como, desenvolvimento e manutenção da saúde, o leite é um alimento dito perfeito. Este é composto por água, lactose, proteínas, gordura, sais minerais nomeadamente cálcio e fósforo, vitaminas, minerais, enzimas, e outros constituintes (figura 2). Assim, torna-se um dos alimentos mais vulneráveis a alterações físico-químicas e à deterioração por microrganismos (Bylund & Pak, 2003).

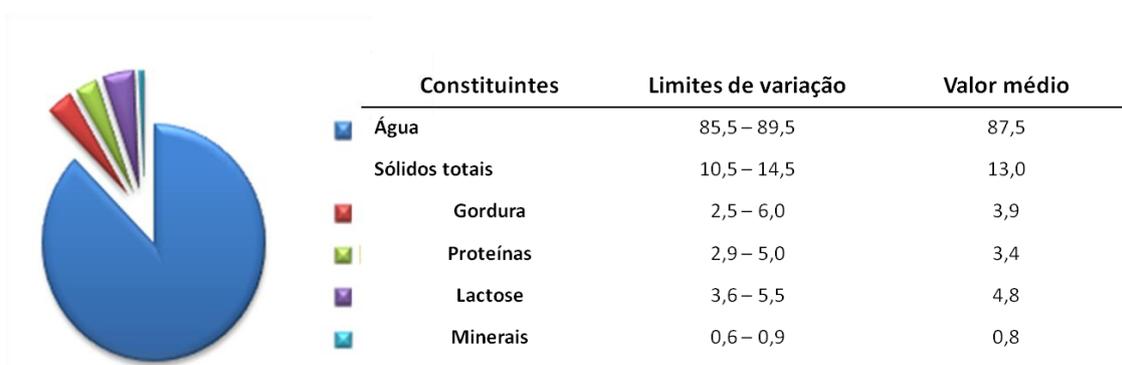


Figura 2 - Composição quantitativa do leite (adaptado de Bylund & Pak, 2003)

A água é o maior constituinte do leite, onde se encontram dissolvidos, dispersos ou emulsionados todos os outros componentes. Esta pode ser encontrada na sua maioria como água livre ou então como água ligada a outros componentes tais como proteínas, lactose e substâncias minerais.

A gordura encontra-se em suspensão no leite, formando pequenos glóbulos contendo principalmente triglicerídeos envolvidos por uma membrana lipoproteica. Além dos triglicerídeos, a gordura é formada por pequenas quantidades de esteróis, ácidos gordos livres e fosfolípidos. No leite de vaca, estes glóbulos têm um diâmetro que varia entre 1,6 e 10 μm e formam uma camada de nata se o leite ficar em repouso. Uma vez que, depende da raça, da alimentação e do período da lactação, a gordura torna-se o constituinte que sofre mais variações.

Um dos constituintes mais importantes no leite são as proteínas e são constituídas por caseínas (proteínas insolúveis) e pelas proteínas solúveis. As caseínas são uma substância coloidal e apresentam-se sob a forma de micelas de fosfocaseinato de cálcio. Existem vários tipos de caseína tais como, a α -caseína, a β -caseína, a κ -caseína e a γ -caseína. As proteínas do soro (solúveis) também têm diferentes tipos como, albumina do soro, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas e proteose-peptonas.

O constituinte responsável pelo seu sabor adocicado é a lactose. Esta pode ser hidrolisada por via da lactase, que a transforma em glucose e galactose. Quando o leite é sujeito a temperaturas elevadas ocorre reações de Maillard entre os grupos aldeído da lactose e os grupos amina de diversas substâncias azotadas, o que leva a formação de compostos designados por melanoidinas. Uma vez que, as melanoidinas são compostos acastanhados, estas reações levam a que o leite apresente uma cor amarelada intensa. Estas reações, além da cor amarelada, levam à perda do valor nutritivo e à formação de compostos redutores.

Os sais minerais encontram-se no leite em pequena percentagem no entanto, tal como os outros constituintes têm influência nas características do leite. De todos os sais minerais os que têm uma maior importância são o cálcio, o potássio, o fósforo, o magnésio e o cloreto de sódio. Alguns dos sais associam-se às proteínas do leite proporcionando assim estabilidade à micela.

No leite podem ainda ser encontradas vitaminas lipossolúveis A, D, E e K e também vitaminas hidrossolúveis como, vitaminas do grupo B e C.

Além de todos os constituintes descritos em cima, é possível encontrar no leite enzimas como lipase, peroxidases e catalase. O papel destas é a degradação dos constituintes originais do leite e a sua atividade é influenciada pelo pH, temperatura (T) e acesso ao substrato.

2.2. Processo de produção de leite

A qualidade microbiológica é um dos aspetos mais importantes para a avaliação do leite, sendo que as contaminações por microrganismos podem ocorrer durante a obtenção, transporte e armazenamento do leite cru ou então durante o processamento deste. Assim sendo, a Lactogal, de forma a garantir e manter a qualidade do leite desenvolveu um processo de produção (figura 3) capaz de destruir na totalidade ou grande parte da flora microbiana presente no leite cru.

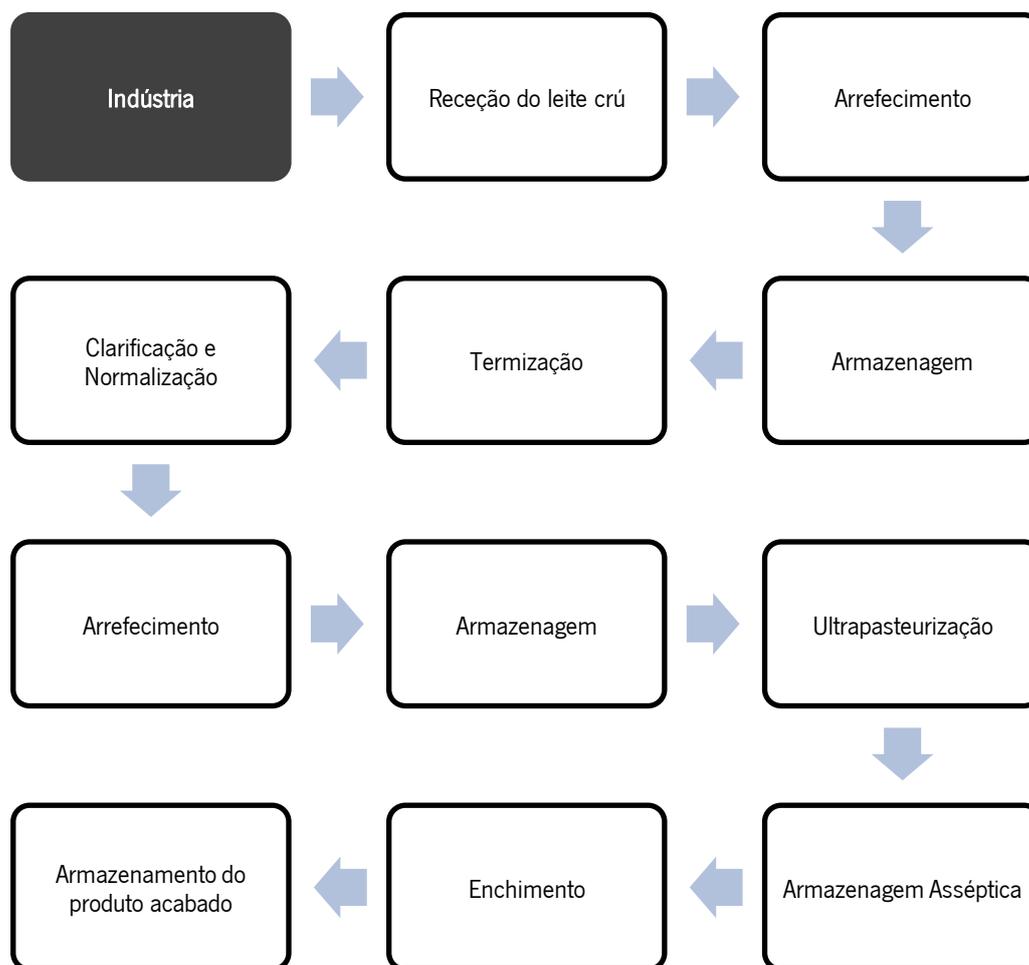


Figura 3- Processo de produção do leite

Mesmo antes do processamento do leite cru é necessário ter em atenção todos os fatores que influenciam a qualidade do leite. Assim sendo, deve haver um controlo da ordenha, da refrigeração e do transporte até à indústria.

A ordenha é habitualmente um processo mecânico e automático de recolha do leite da vaca. Antes da ordenha é importante ter em atenção o local da ordenha, as condições inerentes ao animal, os equipamentos e utensílios, e o ordenhador. Durante este processo deve haver uma limpeza cuidadosa das tetas, a verificação da saúde animal e a observação das condições higiénicas do ambiente.

Depois da ordenha, o leite cru deve ser refrigerado, uma vez que, o leite obtido da ordenha está a uma temperatura próxima de 37 °C, ou seja, é um excelente meio para o crescimento microbiano. A etapa de refrigeração é bastante importante uma vez que, é utilizada para prolongar a permanência do leite no produtor. A refrigeração, além da manutenção da qualidade do leite, previne a evolução bacteriana.

O último passo é o transporte até à indústria, sendo que este deve ser feito em camiões cisterna isotérmicos que mantenham o produto a uma temperatura entre 0 até 10 °C de modo a não alterar a qualidade do leite cru.

Já na indústria, são recolhidas amostras de leite cru para serem feitas análises microbiológicas e físico-químicas com os mais modernos equipamentos laboratoriais. Assim, após a receção do leite cru são feitas as primeiras inspeções organolépticas (aspecto, cheiro e cor), faz-se a prova de álcool, a medição da acidez, a medição do pH e o teste de antibióticos. O leite cru deve apresentar um aspecto, cheiro e cor característico, não deve haver presença de antibióticos, a acidez deve estar entre 16,0 e 18,0 cm³ NaOH/L, os valores de pH devem encontrar-se entre 6,60 e 6,80 e não deve coagular quando sujeito à prova de álcool. Se o produto estiver dentro dos parâmetros analisados dá-se a receção do leite na indústria. Assim sendo, este é arrefecido até a uma temperatura entre os 2 e os 6 °C e em seguida dá-se a descarga para tanques de aço inoxidável isotérmicos e equipados com agitadores que evitam a separação dos glóbulos de gordura.

De maneira a obter um produto adequado para consumo, antes de chegar ao consumidor, o leite cru sofre uma série de tratamentos. O primeiro tratamento a que o leite cru é sujeito é a termização. Nesta etapa o leite é submetido a uma temperatura de aproximadamente 63 °C durante aproximadamente 15 segundos com o objetivo de diminuir a carga microbiana. Após a termização são recolhidas novamente amostras de leite para se verificar que não houve

alterações de pH, acidez e das características organoléticas. Além disso é analisado o índice crioscópico onde se deve obter valores superiores ou iguais a 517 em valor absoluto. A nível microbiológico são feitos testes à flora aeróbia mesófila, flora aeróbia termófila e de esporos termorresistentes.

Os passos seguintes no processo de produção de leite são a clarificação e a normalização. A clarificação é realizada numa centrífuga (figura 4) com velocidade da centrifugação de 2000-3000 rpm, que permite a separação das partículas em suspensão que se encontram no leite. A ausência deste passo levaria a que as partículas formassem um sedimento que seria visível no produto. Além da eliminação das impurezas do leite, com o aumento da velocidade de centrifugação para 5000-7000 rpm ocorre a desnatação, ou por outras palavras, a separação das natas do leite.

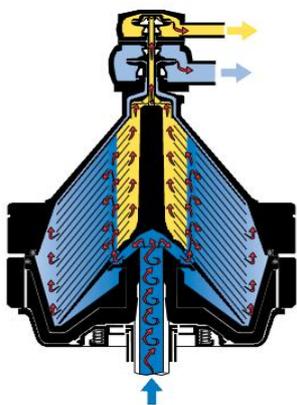


Figura 4- Centrífuga (reproduzido de Bylund e pak, 2003)

O leite entra na parte inferior do equipamento (figura 4) e sob a influência da força centrífuga as partículas e os glóbulos de gordura começam a separar-se de acordo com a sua densidade em relação ao meio. Assim sendo, as partículas que apresentam mais densidade, irão deslocar-se para a periferia do equipamento e acumular-se num espaço apropriado. Enquanto, a nata, ou seja, os glóbulos de gordura, menos densos, ficam no centro e saem por cima (Bylund & Pak, 2003).

A etapa subsequente a clarificação é a normalização e tem como objetivo o ajuste do valor de gordura do leite a um determinado valor em percentagem. Assim sendo, o leite gordo deve apresentar um teor de gordura de 3.5 %, o leite meio gordo um teor de 1.5 % e o magro deve apresentar um teor de gordura máximo de 0.3 %.

Uma das etapas mais importantes a que o leite UHT é submetido é a ultrapasteurização, que combina temperaturas altas (aproximadamente 141 °C) por um rápido período de tempo (aproximadamente 6 segundos), com o objetivo de destruir os microrganismos, aumentar o tempo de prateleira do produto e assegurar que o leite mantenha as suas características organoléticas e nutricionais. Imediatamente a seguir à ultrapasteurização, o leite é novamente arrefecido até uma temperatura de aproximadamente 4 °C num permutador de placas (Figueiredo et al., 2001). Após a adição da gordura e da ultrapasteurização, o leite deve ser

homogeneizado de maneira a desagregar os glóbulos de gordura e distribuí-los de forma uniforme para evitar a formação de nata.

Por fim, o leite ultrapasteurizado é embalado em condições assépticas ou armazenado em um tanque assético designado por tanque pulmão antes de ser embalado.

O enchimento é realizado em equipamentos Tetra Pak (figura 5), onde as embalagens recicláveis permitem que o leite mantenha a sua cor, textura, sabor característico e valor nutricional. Estas são constituídas por seis camadas (figura 6) das quais as duas primeiras, mais internas, de polietileno, seguindo-se alumínio, polietileno, cartão e novamente polietileno. Cada uma destas camadas tem diferentes funções na embalagem: o cartão garante estabilidade e resistência; o polietileno permite que o alimento não tenha contacto com o alumínio e ajuda na proteção contra a humidade externa; e o alumínio protege o alimento do oxigénio e evita a passagem da luz. O resultado é uma embalagem que garante a proteção do leite contra a luz, ar, água e microrganismos, mantem a integridade do leite e além disso aumenta o tempo de prateleira (Pak, 2014).



Figura 5 - Máquina de enchimento Tetra Pak (reproduzido de Tetra Pak, 2014)

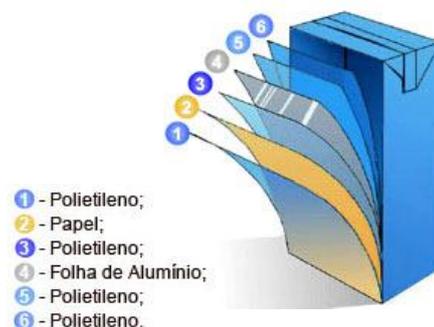


Figura 6 - Camadas das embalagens Tetra Pak (reproduzido de Tetra Pak, 2014)

O último passo, antes de sair para o mercado, é a paletização e armazenamento do produto em estado de quarentena, para que possam ser feitos todos os testes necessários. Quando são conhecidos todos os resultados microbiológicos e físico-químicos que permitam garantir que o produto está próprio para consumo, o produto é libertado e fica disponível para o mercado.

3. Qualidade microbiológica do leite

Quando é referido o termo “qualidade do leite” pode ser interpretado do ponto de vista do processo de obtenção do produto, do processo de produção e se está conforme as exigências dos consumidores. Ou por outro lado, a nível da composição do leite, das suas propriedades nutricionais e tempo de prateleira que este oferece. Assim sendo, de modo a que a qualidade do leite não seja alterada, deve haver um controlo de todas as etapas do processo, desde a produção primária até que o produto chegue ao consumidor. Ou seja, é fundamental que antes do processamento do leite, parâmetros, tais como raça, alimentação do animal, cuidados de higiene e armazenamento, sejam controlados. Além disso toda a linha de processamento, desde a receção do leite na indústria, até a distribuição, deve ser controlada (Neto, 2009; Pales & Santos, 2005).

Uma das maiores preocupações na qualidade do leite é o risco permanente deste produto ser alvo de contaminações por parte de microrganismos, uma vez que, o leite contaminado constitui prejuízos para o produtor, indústria e consumidor. Quando as condições do meio lhes são favoráveis, são capazes de se multiplicarem a uma grande velocidade, levando a alterações de cor, viscosidade, odor, sabor e ainda alterações a nível nutricional. Assim sendo, a qualidade microbiológica do leite constitui um critério importante na qualidade do produto final (Ponciano, 2010).

É possível dizer que um leite com qualidade é um leite com um sabor agradável, alto valor nutritivo, sem agentes patogénicos, sem contaminantes, com baixa contagem de células somáticas e baixa carga bacteriana.

3.1. Principais fontes de contaminação

Como foi dito anteriormente, as contaminações por microrganismos podem ocorrer durante a obtenção, transporte e armazenamento do leite cru ou então durante o processamento deste.

Apesar do leite ao ser sintetizado e secretado nos alvéolos da glândula mamária ser relativamente isento de microrganismos, é praticamente impossível obter um leite estéril, uma vez que, pode haver contaminação por microrganismos do interior da glândula mamária, de uma má higiene ou de um armazenamento inadequado (Harding, 1995).

A contaminação pode advir da glândula mamária, da superfície das tetas e de equipamentos e utensílios mal higienizados mas é ainda necessário ter em atenção a higiene do ordenhador, o úbere do animal e as instalações que o animal se encontra (por exemplo fezes, sujeira), assim como do material de ordenha. Antes da ordenha é ideal que se lave a teta com água limpa, se utilize um produto químico desinfetante, e por fim se seque as tetas com papel toalha (processo de pre-dipping) (Fernandes, 2009). Por outro lado, as contaminações podem provir da presença de doenças no rebanho, como mastite, tuberculose ou brucelose, uma vez que, quando o animal está doente desenvolve células somáticas de modo a responder à infeção (Pales & Santos, 2005).

Além disso, o armazenamento e transporte são dos fatores que mais influencia a multiplicação por parte de microrganismos. Assim sendo, o leite cru deve ser armazenado e refrigerado (4 °C) pouco tempo após a ordenha para que haja uma diminuição da velocidade de multiplicação dos microrganismos (Silva et al., 2012).

Mesmo após todos os processos realizados ao leite cru para a destruição dos microrganismos (pasteurização e ultrapasteurização), pode ocorrer uma recontaminação através de uma má higienização das superfícies. Esta má higienização leva a proliferação de microrganismos até níveis indesejáveis, ou seja altera a qualidade do leite. No entanto a contaminação pode também ocorrer através de poeiras ar, de água sem qualidade, de uma má higienização dos trabalhadores ou de agentes do meio exterior (Ribas, 2008).

A qualidade da água também é um fator a ter em consideração, dado que pode haver contaminações por parte da água utilizada para a limpeza dos tetos, utensílios e equipamentos (Silva et al., 2012).

3.1.1. Microrganismos que contaminam o leite

Devido a sua composição, o leite, é um meio ideal para o crescimento de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e vírus. Como foi dito anteriormente, a contaminação do leite pode ocorrer desde o momento da obtenção do leite, ou seja na ordenha, no transporte, no processamento (recontaminação) ou até nos pontos de venda, quando nestas etapas não são respeitadas boas práticas de fabricação.

O leite é um excelente meio para o crescimento de dois grandes grupos de microrganismos, os desejáveis e os indesejáveis. Os desejáveis são aqueles que são usados para a transformação do leite em produtos fermentados como queijo, iogurtes, entre outros. Por outro lado existem os microrganismos que causam deterioração do alimento, problemas económicos e de saúde pública, limitando assim a durabilidade do produto. Estes são bastante encontrados na indústria de laticínios e podem ser designados por microrganismos deteriorantes e microrganismos patogénicos (tabela 1) (Niamsiri, 2009; Watanuki, 2008).

Os microrganismos denominados de patogénicos são aqueles que podem ser transmitidos ao Homem através do leite causando doenças e, apesar de não ser comum, podem ainda ser responsáveis por mudanças na cor, odor e aroma e nos teores de gordura, lactose e proteína. Na tabela 1 é possível observar as principais bactérias patogénicas presentes no leite (Fernandes, 2009; Niamsiri, 2009).

Os microrganismos deteriorantes são capazes de alterar a composição do produto, ou seja alteram a sua qualidade nutricional, tornando-se assim indesejáveis no leite. Estes microrganismos requerem nutrientes para crescerem e produzem enzimas que são capazes de hidrolisar a lactose, as proteínas, a gordura ou outras substâncias presentes no leite. Esta hidrólise, apesar de não causar danos para a saúde pública, torna o leite impróprio para consumo, uma vez que, altera as suas características, por exemplo as organolépticas (odor e sabor). Os principais grupos de microrganismos deteriorantes podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1 - Principais microrganismos frequentes nos laticínios (Niamsiri, 2009)

		Exemplos
Deteriorantes	Bactérias termodúricas	<i>Microbacterium lacticum</i> ; espécies de <i>Micrococcus</i>
	Bactérias formadoras de esporos	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
	Bactérias produtoras de ácido láctico	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
	Coliformes	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>M. turbeculosis</i>
	Psicotróficos	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Alcaligenes</i>
Patogénicos	<i>Listeria Monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
	Enterobacteriaceae	<i>Salmonella</i> , <i>Sbigella</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
	Gram-negativos	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>B. abortus</i> , <i>C. jejuni</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>Clostridium spp.</i>	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium perfringens</i>

Os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura, podendo ser divididos em psicotróficos, mesófilos e termófilos (Watanuki, 2008).

O grupo das bactérias termófilas é definido por uma temperatura ótima de crescimento entre 50 e 55 °C, no entanto são capazes de se multiplicar a temperaturas acima dos 55 °C. Estas bactérias, normalmente são encontradas em pequeno número no leite, mas podem atingir grandes populações quando o leite é mantido a temperaturas elevadas. Os géneros *Bacillus* e *Clostridium* são dos microrganismos termófilos de maior importância quando se trata de leite (Gleeson et al., 2013; Watanuki, 2008).

Os mesófilos incluem um grupo de microrganismos capazes de se multiplicarem a uma temperatura entre 20 e 45 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 32 °C. Dado que, o leite obtido da ordenha está a uma temperatura próxima de 37 °C, é necessário a refrigeração

do leite logo após a ordenha, para que haja um controlo da multiplicação destes microrganismos. Este grupo compreende a maioria dos contaminantes, tanto deteriorantes como patogénicos, assim, a sua contagem torna-se um excelente indicador da qualidade microbiológica do leite. Uma contagem microbiana elevada no leite pasteurizado pode indicar uma refrigeração deficiente ou uma desinfeção e limpeza inadequada de todos os equipamentos. Além disso, as bactérias mesófilas provocam a acidificação do leite devido à produção de ácido láctico resultante da fermentação da lactose (Watanuki, 2008; Maieski, 2011; Gleeson et al., 2013).

Quanto aos psicotróficos apresentam uma temperatura ótima de crescimento de 20 a 40 °C, no entanto são também capazes de se multiplicarem a temperaturas inferiores a 7 °C (Gleeson et al., 2013). Existem bactérias mesófilas capazes de crescer a temperaturas de refrigeração que também são designadas por psicotróficos. As espécies do grupo das bactérias psicotróficas encontradas no leite são Gram-negativas (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp.) ou Gram-positivas (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp.). No entanto, existe alguns géneros de bolores e leveduras que apresentam características deste grupo. Uma vez que, as bactérias psicotróficas são capazes de se multiplicarem a temperaturas de 7 °C, a refrigeração do leite por longos períodos de tempo pode comprometer a sua qualidade, devido à capacidade destas bactérias produzirem enzimas. As enzimas de maior importância são as proteases e as lipases, que degradam a proteína e a gordura do leite, provocando assim uma série de problemas como alterações de sabor, e odor ou redução do tempo de prateleira do produto. Apesar da pasteurização eliminar a maioria dos psicotróficos, as enzimas proteolíticas e lipolíticas são termorresistentes, ou seja, resistem a este tratamento e permanecem no leite (Watanuki, 2008; Montanhini & Pintob, 2012; Maieski, 2011).

Como foi dito anteriormente, existem microrganismos que não são destruídos pela pasteurização, sendo estes designados por termodúricos. Dos microrganismos termodúricos destacam-se aqueles que têm a capacidade de formar esporos, pois podem alterar a sua forma vegetativa de modo a conseguir resistir a condições extremas, como altas temperaturas aplicadas pelo tratamento UHT (Watanuki, 2008).

Alguns dos microrganismos mesófilos e psicotróficos podem ser termodúricos, devido à sua capacidade de formarem esporos. Os mais comuns são os psicotróficos termodúricos e são representados pelos géneros *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*,

Clostridium e principalmente pelo *Bacillus* spp, sendo os dois últimos de maior importância na microbiologia alimentar. Uma vez que, os psicotróficos formadores de esporos do género *Bacillus* resistem a altas temperaturas, torna-se interessante a sua pesquisa (Watanuki, 2008).

3.1.1.1. *Bacillus Cereus*

De todas as espécies de *Bacillus*, uma das mais preocupantes na indústria dos alimentos, é o *Bacillus cereus* devido à sua capacidade de produzir toxinas, causando intoxicação alimentar, esporos, que resistem ao tratamento térmico e deterioração dos alimentos (Watanuki, 2008).

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa, tem a forma de bastonetes de grande dimensão (cerca de 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento) e capacidade de formar esporos resistentes a elevadas temperaturas. A sua temperatura ótima de crescimento é de 28 a 35 °C, a faixa de pH em que ocorre multiplicação varia entre 5 e 9 e a atividade da água (*a_w*) mínima para o seu crescimento é de 0,94 (Lin, 1997).

Uma vez que, os esporos formados pelo *Bacillus cereus* podem sobreviver aos tratamentos térmicos utilizados na indústria, este é considerado um microrganismo termodúrico. Além disso, algumas estirpes podem ser caracterizadas como psicotróficas, pois são capazes de se multiplicar a temperaturas de refrigeração. Assim sendo, estes microrganismos são capazes de multiplicar numa gama entre 3 e 75 °C tornando-se assim um microrganismo de grande preocupação para a indústria (Montanhini & Pintob, 2012).

Tem a capacidade de produzir toxinas classificadas em quatro grupos distintos: enterotoxinas, hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase fosfatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) e toxina emética. Das enterotoxinas e das toxinas eméticas, responsáveis por intoxicações alimentares, as últimas são provavelmente as mais perigosas, já que são extramente resistentes a altas temperaturas, pH extremos e à degradação proteolítica (Finlay et al., 2000; Drobniowski, 1993; Rezende-Lago et al., 2007).

O *Bacillus cereus* pode metabolizar uma série de compostos, incluindo hidratos de carbono, proteínas, peptídeos e aminoácidos para o crescimento e energia. Dos hidratos de carbono utilizados, a sacarose, a glicose e a frutose são os mais comuns, e representam uma fonte de nutrientes para o crescimento bacteriano. Alguns dos principais produtos produzidos a partir da sacarose ou da glicose durante a respiração anaeróbica incluem L-lactato, acetato, formato, succinato, etanol e dióxido de carbono (Mols et al, 2007; Watanuki, 2008).

Na indústria de produtos lácteos, o *Bacillus cereus* já foi encontrado em leite cru, pasteurizado, UHT, leite em pó, leites fermentados e outros derivados lácteos. Uma vez que, a sua presença pode dever-se tanto à resistência do microrganismo ao tratamento térmico, como à contaminação do alimento após o tratamento (Lin, 1997). Ou seja, a contaminação de *Bacillus cereus* pode advir do contato direto ou indireto com solo e poeiras durante a ordenha, tetos sujos e fezes. Por outro lado, a sua presença no leite processado pode também ser associada à ocorrência de contaminação pós-processamento. Esta possível recontaminação deve-se ao facto do *Bacillus cereus* possuir a capacidade de adesão e de formação de biofilmes nas superfícies dos equipamentos utilizados para o processamento do leite, sendo dificilmente removidos por procedimentos de higienização rotineiros (Maieski, 2011; Salustiano et al., 2009).

Bacillus cereus, além da redução do prazo de validade, pode provocar fenómenos indesejáveis nos laticínios, devido a ser capaz de sintetizar uma variedade de enzimas, entre elas, as proteases e lipases. Estas desenvolvem propriedades sensoriais indesejáveis: as proteases podem levar a geleificação e provocar um sabor amargo no leite UHT; enquanto as lipases atuam nos ácidos gordos do leite originando odor indesejável no leite pasteurizado e UHT (Montanhini & Pintob, 2012).

A legislação portuguesa não faz referência específica em relação à quantificação do *Bacillus cereus* presente no leite, no entanto, a legislação estabelece que o leite não deve apresentar microrganismos patogénicos.

3.1.1.2. *Escherichia coli*

Theodor Von Escherich foi o primeiro a descrever a *Escherichia coli* em 1885. Na época este microrganismo foi designado por *Bacterium coli commune* e, em 1958, recebeu a denominação atual, *Escherichia coli* em sua homenagem.

A *Escherichia coli*, mais comumente conhecida por *E. coli*, é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, que pertence à família Enterobacteriaceae. Possui forma de bastonete, com um tamanho de 1,1 - 1,5 µm por 2,0 - 6,0 µm, sendo normalmente móvel devido a flagelos que apresenta em volta das células.

A sua parede celular é composta por três camadas, a membrana citoplasmática, a membrana exterior e uma camada de peptidoglicano que separa as duas membranas anteriores. A membrana celular externa contém proteínas, fosfolípidos e lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é uma molécula complexa que contém lipídeos e hidratos de carbono e que consiste em três componentes: lipídeo A, um cerne polissacarídeo e antígenos O, que são polissacarídeos. O lipídeo A, parte lipídica do LPS, é também conhecido como endotoxina que é causadora de patogenicidade e maior responsável de virulência. Na superfície exterior, as bactérias podem ter fimbrias ou adesinas que facilitam a sua fixação, impedindo saírem do corpo por arrastamento pela urina ou diarreia. A superfície pode estar coberta com uma camada de polissacárido designada por cápsula. Com base nas diferentes estruturas antigénicas de O-antígenos, K-antígenos (capsulares) e H-antígenos (flagelar), as estirpes de *E. coli* podem ser divididos em O, H e K serotipos (Tortora et al., 2012; Lehtolainen, 2004).

A *E. coli* faz parte do grupo dos coliformes fecais ou também chamado de coliformes termotolerantes, que são capazes de produzir ácidos e gás. Desenvolve-se entre os 10 °C e os 50 °C, mas a temperatura ótima de crescimento ronda os 37 °C. O seu habitat natural é o intestino dos seres humanos e de outros animais de sangue quente, sendo por isso considerada indicadora de contaminação fecal de alimentos. Elevadas contagens de *E. coli* e de coliformes totais, normalmente, indicam falhas ao nível da higiene.

A maioria das estirpes de *E. coli* não representa qualquer perigo para o seu hospedeiro, no entanto, algumas estirpes podem provocar doenças nos seres humanos, como por exemplo gastroenterite e infeções urinárias. A *E. coli* pode ser classificada com base nos seus fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndromas clínicos e serologia. Baseado nas

características de virulência consideram-se a *E. coli* enteropatogénicas (EPEC), a *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), a *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) e a *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC).

A *E. coli* é capaz de fermentar a glicose e a lactose, com a produção de ácidos e gases. A glicose é fermentada pela *E. coli* produzindo ácido láctico, acético e fórmico, sendo o ácido fórmico hidrolisado a hidrogénio e dióxido de carbono. É ainda capaz de utilizar diversas fontes de carbono como acetato, glicose e lactose que são usadas para crescimento, porém o citrato não pode ser utilizado. Produz β -galactosidase e indol, mas não hidrolisa a ureia nem produz sulfito de hidrogénio.

A *Escherichia coli* é responsável por diversas doenças envolvendo o consumo de produtos de origem animal, destacando-se de entre estes produtos, o leite e seus derivados. Apesar destes microrganismos serem destruídos pela pasteurização, podem aparecer no leite UHT devido a um tratamento térmico ineficaz ou por recontaminação, devido a uma lavagem ineficiente dos equipamentos da fábrica. Uma vez que, a sua presença no leite é de grande preocupação, na indústria são feitos testes para a detetar. A deteção da *E. coli* no leite pode ser feita utilizando técnicas tradicionais como a contagem padrão em placa, no entanto, com o passar do tempo e com a necessidade da deteção de microrganismos num curto espaço de tempo foram sendo desenvolvidas outras técnicas mais rápidas e automatizadas, como a citometria de fluxo.

3.2. Crescimento microbiano

O crescimento microbiano é definido como o aumento do número de células microbianas numa população. Este crescimento, ou seja, a capacidade dos microrganismos, presentes num alimento, se multiplicarem depende de uma série de fatores relacionados com as características próprias do alimento (fatores intrínsecos) e os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (fatores extrínsecos) (Assis, 2007).

Quando a população microbiana cresce, ocorre também um aumento de todos os seus componentes químicos. Assim, quando é referida a duplicação da biomassa na fase exponencial, é também associada a duplicação de outros constituintes como proteínas, DNA ou RNA.

Portanto, em condições de crescimento, o aumento da população (dN) num intervalo infinitamente pequeno (dt) é proporcional à biomassa presente nesse intervalo de tempo (equação 1) (Lengeler et al., 1999; Rodrigues, 2002).

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (1)$$

Na equação 1, N representa a densidade populacional, dN/dt a taxa de crescimento da população em cada instante e μ a taxa específica do crescimento. Se a equação 1 for integrada obtém-se a equação 2, onde N_t e N_0 representam a densidade populacional nos tempos t e t_0 , respetivamente (Lengeler et al., 1999; Rodrigues, 2002).

$$N_t = N_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad (2)$$

Esta última equação pode ser expressa em termos logarítmicos, pela equação 3 ou 4 (Lengeler et al., 1999; Rodrigues, 2002).

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = \mu(t-t_0) \quad (3)$$

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu(t-t_0) \quad (4)$$

A equação que representa o crescimento exponencial de uma população microbiana, equação 4, corresponde à equação de uma reta, onde $y = \ln N_t$ e $x = (t-t_0)$.

O significado de μ torna-se evidente quando se considera a duplicação de N para $2N$, que leva um tempo de geração t_d . Assim, quando $N = 2N_0$ e $t-t_0 = t_d$, a equação 3 é convertida para a equação 5 (Lengeler et al., 1999; Rodrigues, 2002).

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} \quad (5)$$

O número de células pode ser medido em termos da concentração celular, onde é medido o número de células por unidade de volume (UFC/mL ou CIB/mL). Usualmente a determinação da concentração celular é realizada pelo método de referência, no entanto, hoje em dia, existem técnicas mais automatizadas que fazem essa mesma determinação. Esta quantificação permite traçar uma curva de crescimento de um determinado microrganismo ao longo do tempo. Uma curva de crescimento típica é caracterizada pela variação da taxa de crescimento microbiano ao longo do tempo e apresenta quatro fases características (figura 7) (Assis, 2007; Rodrigues, 2002).

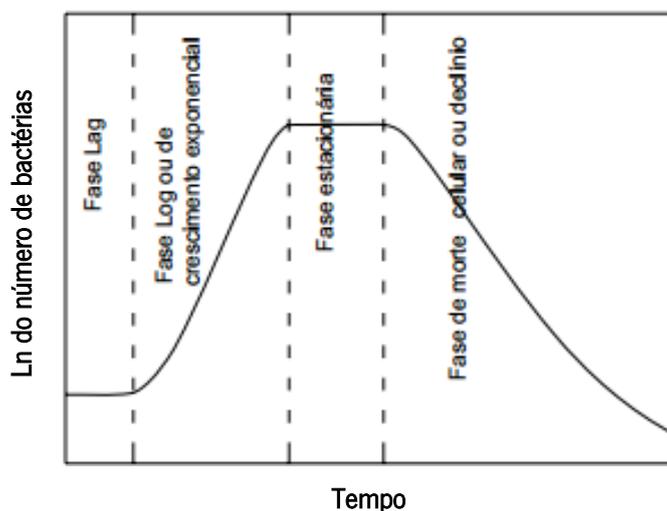


Figura 7 - Curva de crescimento bacteriano em sistema fechado (adaptado de Assis, 2007)

Como é possível observar na figura 7 a curva de crescimento pode ser dividida em quatro fases distintas: fase lag, fase exponencial ou log, fase estacionária e fase de declínio ou morte celular.

A primeira fase é uma fase de adaptação metabólica das células ao novo ambiente. Nesta fase o número de indivíduos não aumenta e a sua duração é variável. Após a fase lag as células iniciam o processo de multiplicação celular atingindo um tempo de geração/ tempo de duplicação da população constante (t_d). Nesta fase, a taxa específica de crescimento (μ) aumenta

de zero até ao seu valor máximo (μ_{max}), atingindo-se a fase exponencial de crescimento. A duração desta fase depende fundamentalmente da concentração de nutrientes essenciais para o crescimento. Quando um ou mais nutrientes se tornam limitantes e/ou ocorre acumulação de metabolitos inibidores de crescimento, as células torna-se menos capazes de gerar ATP e a taxa de crescimento diminui, ou seja entra-se numa fase de desaceleração onde a taxa específica de crescimento diminui do seu valor máximo até zero. Quando a taxa específica de crescimento é igual a zero atinge-se a fase estacionária. Nesta fase ocorre o esgotamento de um ou mais nutrientes. A última fase é a fase de declínio, onde as células perdem a capacidade de se dividirem e o número de células viáveis decresce exponencialmente até completa extinção. Nesta fase algumas células assumem outras formas, como por exemplo, em bactérias formadoras de esporos onde os esporos sobrevivem (Assis, 2007; Rodrigues, 2002).

3.3. Importância da higienização das superfícies

De forma a garantir a segurança dos consumidores, a indústria dos laticínios tem vindo a implementar sistemas de gestão de segurança alimentar/HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*). Este sistema, baseado na análise de perigos e na identificação de pontos críticos de controlo tem de cumprir um conjunto de pré-requisitos e boas práticas de fabrico (Baptista, 2003).

Após o processamento do leite, os equipamentos, utensílios, pisos, paredes e o ambiente de maneira geral, podem apresentar uma elevada carga de resíduos como hidratos de carbono, gorduras, proteínas e minerais, que são suscetíveis de contaminação microbiana (Ribas, 2008). Assim, de modo a que o leite não seja contaminado, além da implementação de planos HACCP, junta-se também um programa de higienização, que inclui limpeza e desinfeção das instalações, equipamentos, utensílios e superfícies que direta e indiretamente entram em contacto com o leite. A implementação deste programa necessita de alguns parâmetros tais como: utilização de agentes de limpeza e desinfeção; um programa de limpeza e desinfeção das instalações, equipamentos, utensílios e superfícies; realização de testes que comprovem a eficiência do programa; e registo dos desvios e ações corretivas realizadas (Baptista, 2003).

A primeira fase do programa de higienização é a limpeza e têm como objetivo a remoção de toda a sujidade que se encontra nas superfícies, equipamentos e utensílios. Esta etapa inclui a lavagem prévia com água, a aplicação de detergentes, e o enxaguamento dos resíduos. Apesar do objetivo principal da limpeza não ser a destruição dos microrganismos, devido à ação mecânica da água e à aplicação de detergentes, a carga bacteriana diminui. Assim sendo, se a limpeza for executada de forma rigorosa, verifica-se uma diminuição do grau de contaminação inicial (Baptista, 2003; Ribas, 2008).

Existem bactérias capazes de se adaptarem a condições rigorosas ao formarem um biofilme. Os biofilmes são formados pela população microbiana envolvida numa matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares que são produzidas pelos próprios microrganismos. Estes podem desenvolver-se em quaisquer superfícies sejam elas bióticas ou abióticas. A formação deste biofilme constitui uma forma de proteção para desenvolvimento dos microrganismos, permitindo assim a sua sobrevivência em ambientes hostis. Concluindo, os microrganismos soltam filamentos que aderem entre si e também à superfície tornando-os muito mais resistentes. Por esta razão há a necessidade de uma segunda etapa após a limpeza – a desinfecção (Baptista, 2003).

O objetivo primordial da desinfecção é a destruição dos microrganismos, principalmente os patogénicos, que estando presentes nas superfícies podem contaminar o alimento. Nesta etapa os agentes mais importantes são os desinfetantes (Baptista, 2003). Nesta fase do programa dá-se a eliminação dos microrganismos patogénicos e a redução do número de microrganismos decompositores até níveis seguros. É importante que haja uma limpeza adequada dos equipamentos para que a desinfecção seja eficiente, uma vez que, se houver resíduos de uma limpeza inadequada, a ação dos desinfetantes pode ser reduzida ou tornar-se nula, pois a matéria orgânica pode servir de suporte nutritivo e refugio aos microrganismos (Baptista, 2003; Ribas, 2008).

A preocupação com um programa de higienização eficaz e eficiente deve estar sempre presente. A limpeza deve ser realizada sempre que possível e necessário, podendo ser aproveitadas as paragens na linha de produção. Além disso, independentemente das limpezas que forem realizadas no meio do processo, no final deve ser realizada uma limpeza de todos os equipamentos, utensílios e superfícies (Baptista, 2003). Já a desinfecção deve ser feita imediatamente antes do novo ciclo, uma vez que, os equipamentos e utensílios ficam a espera de um novo ciclo para serem usados (Ribas, 2008).

Quando implementado um sistema relativo à limpeza e desinfeção de uma indústria de laticínios é necessário ter em atenção a legislação em vigor, nomeadamente o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004.

4. Viabilidade Celular

Para uma melhor percepção das técnicas a seguir referenciadas no ponto 5, torna-se necessária a compreensão de alguns aspetos relacionados com a viabilidade celular.

A viabilidade bacteriana pode ser definida pela capacidade das bactérias formarem colónias. No entanto, é possível diferenciar o estado metabólico de uma célula individual, utilizando critérios como o potencial de membrana citoplasmática e a integridade da mesma e o funcionamento de alguns sistemas de transporte ativo (Evangelista, 2008).

As células apresentam uma membrana que lhes permite comunicar com o ambiente que as rodeia, através de sistemas de transporte ativo e passivo. Os sistemas de transporte ativo geram um gradiente eletroquímico que é fundamental para o perfeito funcionamento de uma célula saudável. Se a célula estiver metabolicamente ativa, ou seja, uma célula saudável e funcional, a sua membrana encontra-se intacta e polarizada. Estas são designadas por células viáveis, uma vez que, tem a capacidade de se multiplicarem (Silva et al., 2004).

Por outro lado, se a célula não apresentar uma membrana intacta é incapaz de manter ou gerar o gradiente de potencial eletroquímico que origina o potencial de membrana. Além disso, se a estrutura interna da célula estiver exposta ao meio ambiente, a célula acaba por se decompor. Todas estas etapas levam à morte celular (Silva et al., 2004).

As bactérias são expostas com frequência a stresses gerados por mudanças na disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, salinidade e iluminação solar, entre outros fatores. O leite é exposto a altas temperaturas durante o processo de produção, e como foi descrito anteriormente esses processos tem como objetivo a destruição dos microrganismos. No entanto, existem microrganismos com a capacidade de se adaptar às novas condições, neste caso às altas temperaturas. Assim sendo, alguns são capazes de produzir esporos e outros podem entrar num estado fisiológico chamado viável mas não cultivável (VNC). O estado VNC é definido como um estado fisiológico onde os microrganismos apresentam as mesmas características das células viáveis, como atividade respiratória, manutenção do potencial de membrana e atividade enzimática, mas não tem a capacidade de se multiplicarem (Oliver, 2005; Silva et al., 2004; Oliveira, 2012). As bactérias no estado VNC podem sofrer uma “ressuscitação” ou seja podem recuperar a sua capacidade de se multiplicarem.

5. Técnicas de contagem de microrganismos

A necessidade de obter um leite com qualidade levou a que determinados parâmetros como características sensoriais, contagem de microrganismos, contagem de células somáticas, ponto de congelamento e composição fossem avaliados. Sendo a contagem bacteriana uma das ferramentas mais importantes de monitorização da qualidade microbiológica, ao longo do tempo foram desenvolvidos métodos para a contagem de microrganismos.

O método de referência para enumeração de microrganismos é o de contagem padrão em placas (CPP), no entanto, apesar de ser um método muito simples é muito moroso. Desse modo, novas tecnologias foram sendo desenvolvidas e com o passar dos anos houve o aparecimento de novos métodos mais expeditos e com menos influência de erros humanos devido ao seu automatismo. Um exemplo disso é a citometria de fluxo.

5.1. Método de referência

Como foi dito anteriormente, a viabilidade bacteriana pode ser definida pela capacidade das bactérias formarem colônias, portanto, é possível dizer que a enumeração de microrganismos viáveis está bastante relacionada com a contagem de colônias. Com esse objetivo é habitualmente utilizado o método de contagem padrão em placas.

A contagem padrão em placas (figura 8) é um dos métodos de referência e é utilizado para contagem de microrganismos aeróbios e facultativos. No entanto, este método só é capaz de enumerar os viáveis cultiváveis, uma vez que, os viáveis mas não cultiváveis não crescem em meio de cultura (Castro, 2007; Evangelista, 2008).

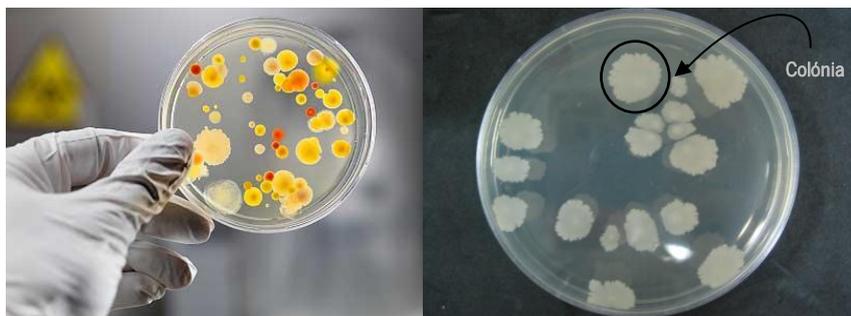


Figura 8 - Placas contaminadas

O método consiste na enumeração das colónias em placa (figura 8) após incubação por tempo e temperatura adequados em meio agar padrão para contagem. Este permite estimar o número de unidades formadoras de colónias por mililitro de leite (UFC/mL) (Jatobá, 2009). As amostras devem ser previamente diluídas para que se obtenha uma contagem final entre 30 a 300 colónias em cada placa de Petri e para que os resultados obtidos sejam estatisticamente válidos, é necessário fazer as placas em duplicado para cada diluição (Evangelista, 2008).

A vantagem deste método é a sua simplicidade e facilidade de execução, a não exigência de equipamentos sofisticados nem técnicos especializados, apenas bem capacitados (Castro, 2007).

Contudo, existem algumas desvantagens sendo uma das mais importantes o facto do método contar apenas colónias. Ou seja, pode subestimar a quantidade de bactérias presentes no leite, uma vez que, uma colónia pode ser formada por microrganismos individuais ou por agregados de microrganismos. Por outro lado, somente vão ser detetados os microrganismos capazes de se desenvolver nas condições específicas do meio (nutrientes, disponibilidade de oxigénio, tempo/temperatura incubação). Além disso, este método necessita de no mínimo 72h de incubação para a obtenção dos resultados tornando-se assim um problema para a indústria visto ser muito moroso (Castro, 2007; Neves, 2008).

Principalmente por se tratar de um método muito demorado, outras técnicas têm sido utilizadas pela indústria dos lacticínios. Apesar destas terem um investimento inicial mais caro, quando comparado o custo da análise com o método de referência torna-se vantajoso o uso de outras técnicas. Porém, como a contagem padrão em placas é o método de referência, todos os outros métodos implementados devem ser correlacionados com ele (Evangelista, 2008).

5.2. Citometria de Fluxo

As limitações dos métodos de referência fizeram com que ao longo dos anos, houvesse uma intensa investigação para desenvolvimento de outros métodos mais rápidos e automatizados, como por exemplo a citometria de fluxo. Os primeiros equipamentos de citometria de fluxo surgiram na década de 1970 e foram sendo desenvolvidos até aos dias de hoje de modo a que fosse possível a medição simultânea de múltiplas características físicas,

químicas e biológicas de células em suspensão. De todas as aplicações, destacam-se as relacionadas à farmacologia, microbiologia, biologia molecular e genética (Gunasekera et al., 1999; Campagnaro, 2012).

A citometria de fluxo é uma técnica para a contagem e análise de partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Ou seja, é uma tecnologia que mede e analisa partículas individuais em populações homogêneas ou heterogêneas, à medida que fluem numa corrente de fluido através de um feixe de luz (Jepras et al., 1995).

Existem diversas empresas que fornecem equipamentos de citometria de fluxo, sendo a bioMérieux uma delas. Esta possui sistemas de detecção rápida de contaminação microbiana, como o D-Count® (figura 9), que combinam velocidade, confiabilidade e sensibilidade (bioMérieux, 2014). O D-Count® é, neste momento, o equipamento utilizado pela Lactogal para a análise da qualidade microbiana pois este é capaz de quantificar a flora total presente no produto final, incluindo bactérias e bolores.

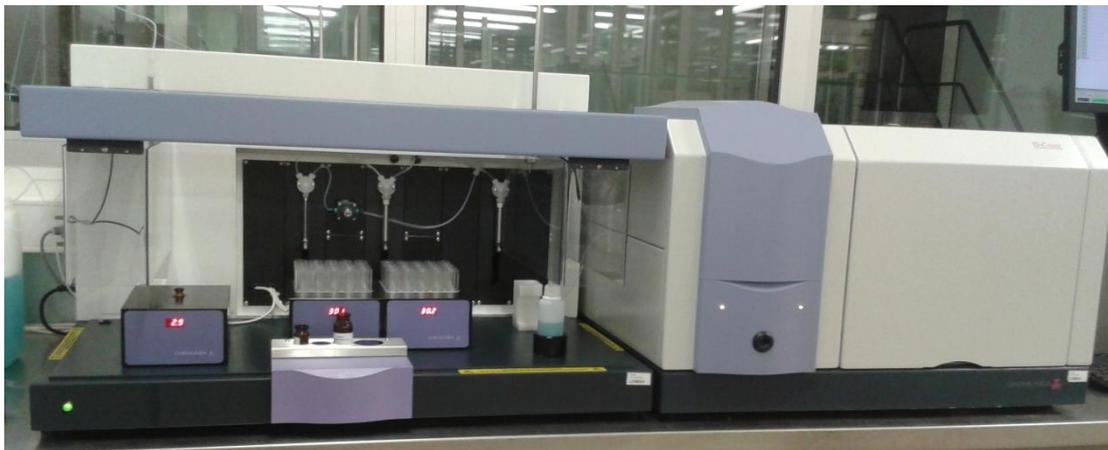


Figura 9 - D-Count®

Este equipamento tem como critérios de viabilidade, essencialmente, a atividade enzimática do microrganismo e a sua integridade membranar. Somente microrganismos viáveis, com metabolismo activo, são capazes de clivar o substrato fluorescente, resultando na libertação do fluorocromo resultante (bioMérieux, 2014).

Uma vez que, o interesse recai sobre contagens de células viáveis, antes da amostra ser analisada dá-se a marcação (figura 10) dos microrganismos com metabolismo ativo. Esta marcação é feita automaticamente pelo equipamento D-Count®. Assim sendo, as amostras são

I- Introdução

incubadas com um substrato de viabilidade não fluorescente, sem carga, que atravessa a membrana das células viáveis por transporte passivo. Já no citoplasma do microrganismo, o substrato de viabilidade é clivado por uma enzima presente em todos os microrganismos. Apenas microrganismos com metabolismo ativo são capazes de clivar o substrato, levando assim à libertação de um fluorocromo fluorescente. Além disso, só são capazes de reter o substrato fluorescente os microrganismos com membrana citoplasmática íntegra. Assim, é possível garantir que apenas microrganismos viáveis, incluindo também aqueles que não são cultiváveis, sejam marcados e posteriormente contados (bioMérieux, 2014; Jepras et al., 1995).

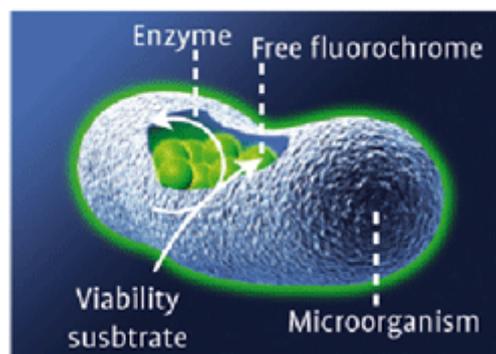


Figura 10 - Marcação dos microrganismos (reproduzido de bioMérieux, 2014)

Após a marcação, as amostras são injetadas, uma a uma, num capilar onde as células passam de forma alinhada por um laser (figura 11) de comprimento de onda constante (488 nm), que ao interceder as células emite uma luz, de acordo com as suas características. Quando o laser passa por células marcadas, o fluorocromo presente vai ser excitado e a fluorescência verde é detetada a um comprimento de onda de 515 nm (bioMérieux, 2014; Jepras et al., 1995; Campagnaro, 2012).

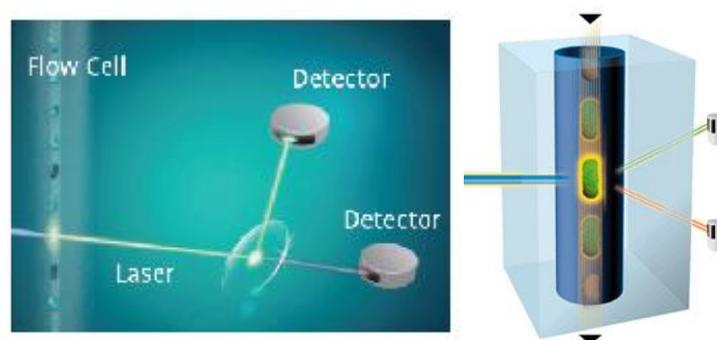


Figura 11 – Sistema de detecção das células marcadas (reproduzido de bioMérieux, 2014)

De modo a que os resultados sejam convertidos em número de bactérias, um equipamento de citometria de fluxo além do sistema de fluxo e do laser, é também composto por um sistema ótico, recetores e um sistema eletrónico. A radiação emitida é detetada pelo sistema ótico e é enviada para o sistema de filtros. Os sistemas de filtros bloqueiam determinados comprimentos de onda da luz incidente e deixam passar somente a luz de comprimento de onda desejado. Finalmente, através do sistema eletrónico, os sinais luminosos são convertidos em sinais elétricos, que por sua vez são enviados para o computador. Já no computador é possível analisar os dados, sendo que os sinais elétricos são transformados em número de bactérias. Os resultados são expressos em contagem individual de bactérias (CIB) e são apresentados em número de bactérias por mL de leite (CIB/mL) (Jepras et al., 1995; Medical, 2000; Technologies, 2014; Campagnaro, 2012).

Relativamente a outros métodos de contagem de microrganismos este apresenta algumas vantagens. Os seus resultados são mais confiáveis, uma vez que, em comparação com o método de referência, são mais precisos e reais. É um método muito mais rápido, sendo capaz de analisar cerca de 50 amostras em cerca de uma hora. Isto leva a uma resposta mais rápida de incidentes de contaminação, confirmação mais rápida da qualidade do leite, diminuição do tempo de armazenagem do leite em ambiente de quarentena e diminuição de uma possível interrupção da produção.

5.3. Diferença de custos de análise dos dois métodos

Além de todas as vantagens descritas anteriormente, em termos de análise, o D-Count® torna-se mais barato quando comparado com o método de referência. Obviamente que só pode ser considerado o custo de análise dado que o investimento inicial é muito dispendioso em comparação com o investimento inicial da contagem padrão em placa que é nulo.

Os cálculos feitos em relação às análises realizadas na Lactogal são uma estimativa dos custos anuais, ou seja, fez-se uma estimativa do número de amostras analisadas ao longo de um ano e calculou-se os custos dos dois métodos. Na Lactogal são analisados no D-Count® cerca de três *Batch* por dia, correspondendo a cerca de 750 amostras. É importante referir que em cada *Batch* são apenas analisados 50 tubos, no entanto, em cada tubo são colocadas 5 amostras o que leva a uma análise de 250 amostras em cada *Batch*. Quanto à contagem padrão em placa é necessária a análise das 250 amostras em separado.

Em relação aos custos de análise do D-Count® foram considerados todos os regentes utilizados num *Batch*, sendo que o custo de cada *Batch* ronda os 70 €. No caso dos custos de análise do método de referência foram consideradas as quantidades utilizadas de cada meio de cultura (RCA e MPCA) e as placas utilizadas (para cada amostra são utilizadas 4 placas). Neste caso, o preço de análise de 250 amostras (um *Batch* pelo D-Count®) é cerca de 85 €. Como é possível observar, o custo de análise do D-Count® torna-se mais barato quando comparado com o método de referência.

Apesar de ser possível perceber através dos valores apresentados anteriormente que o D-Count® em termos de análise é menos dispendioso, é interessante para a Lactogal perceber qual a quantia que pode poupar por ano ao utilizar o D-Count®. Assim, através de uma extrapolação, calculou-se uma estimativa dos custos de análise de cada um dos métodos ao longo de um ano (tabela 2). É possível então concluir que a Lactogal poderá poupar cerca de 16000,0 € por ano, se utilizar o D-count® para verificar a qualidade do leite em vez do método de referência.

Tabela 2 – Exemplo comparativo dos gastos num ano do D-Count® e da contagem padrão em placa

Número de <i>Batch</i> / ano	Custo D-Count® (€/ano)	Custo Contagem padrão em placas (€/ano)	Diferença dos dois métodos (€/ano)
1095	78000,0	93000,0	16000,0

II- Materiais e Metodologias

Este capítulo está dividido em três partes: aplicação da citometria de fluxo na avaliação higiênica de superfícies; aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de *Bacillus cereus*; e aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de *Escherichia coli*. A divisão foi realizada por uma questão de interpretação mais simples e direta.

Em cada um dos subcapítulos faz-se referência aos métodos utilizados para responder aos objetivos propostos em cada etapa, onde são referidos todos os materiais e procedimentos utilizados.

1. Aplicação da citometria de fluxo na avaliação higiénica de superfícies

Nesta etapa do trabalho, foi utilizado o método da zaragatoa e posteriormente o método de contagem de placas em paralelo com a citometria de fluxo para serem analisadas microbiologicamente as amostras. Todos os passos desta experiência estão divididos em diferentes partes para uma interpretação mais simples e direta.

1.1. Método por zaragatoa

Inicialmente foram escolhidas diferentes superfícies, tanto limpas como sujas. Assim, foram analisadas várias superfícies antes e depois de lavagem e várias mãos limpas e depois de lavadas e desinfetadas. Além disso, foram recolhidas amostras de água da torneira para posterior análise. Antes da recolha das amostras de água para frascos estéreis, a torneira manteve-se aberta por 15 minutos.

Antes de iniciar este método foi necessário uma preparação prévia das zaragatoas, ou seja, foi necessário colocar num tubo de ensaio 25 mL de solução de Ringer e mergulhar a zaragatoa nesta mesma solução. Após mergulhada, esfregou-se a zaragatoa na superfície (numa área de aproximadamente 20 cm²) que se pretendia analisar e depois retomou novamente para a solução de Ringer para que os microrganismos retidos na zaragatoa passassem para a solução.

1.2. Diluições

As amostras previamente preparadas pelo método da zaragatoa descrito no ponto 1.1. foram sujeitas a diluições, uma vez que, não era possível saber a carga microbiológica que iria ser encontrada na amostra.

Para a realização das diluições utilizou-se solução de Ringer e através do método observado na figura 12 foram atingidas as diluições necessárias.

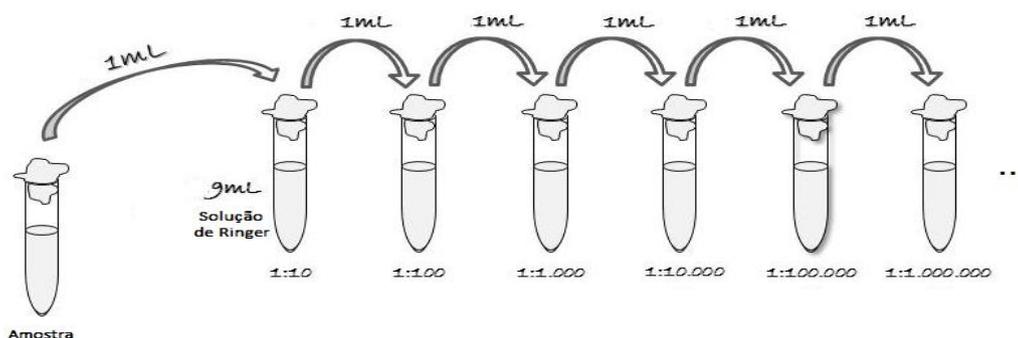


Figura 12 - Diluições Sucessivas

1.3. Citometria de Fluxo – D-Count®

Como já foi dito anteriormente, a citometria de fluxo é utilizada para contar o número de células presentes numa amostra. Assim sendo, foi utilizado um equipamento de citometria de fluxo fornecido pela bioMérieux – o D-Count® (figura 13).

Em cada tubo do aparelho era colocado 1 mL de cada amostra, em triplicado e ainda mais dois tubos dos quais um vazio que funcionava como controlo negativo e um tubo com 500 µL de leite cru que funcionava como controlo positivo, dando um total de 25 tubos (um *Batch*).

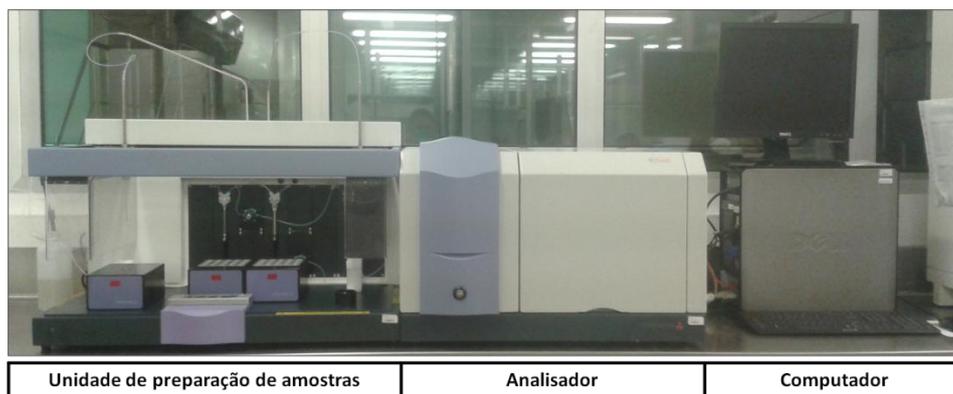


Figura 13 - Componentes do equipamento D-Count®

Antes da realização de qualquer *Batch* no D-Count®, era sempre feita uma lavagem do equipamento utilizando o reagente ChemSol S e a posterior calibração com a adição do reagente Standard G. Além disso, era necessário a adição de 15 gotas de um agente estabilizante no frasco do esgoto de modo a evita a formação de espuma no mesmo. Como o equipamento contém dois pipetadores, estes foram mergulhados no Cleaning 5. Estes permitiam a lavagem e descontaminação entre as amostras analisadas. Foi necessária a preparação prévia de alguns reagentes: o CSV e CS26B foram misturados e homogeneizados com o vortex e o reagente CSR foi misturado ao Diluent II, onde a essa mistura foi adicionado 15 gotas de Isored. Todos os reagentes e os 25 tubos foram colocados nas suas posições (figura 14) e o aparelho estava pronto para iniciar a análise das amostras.

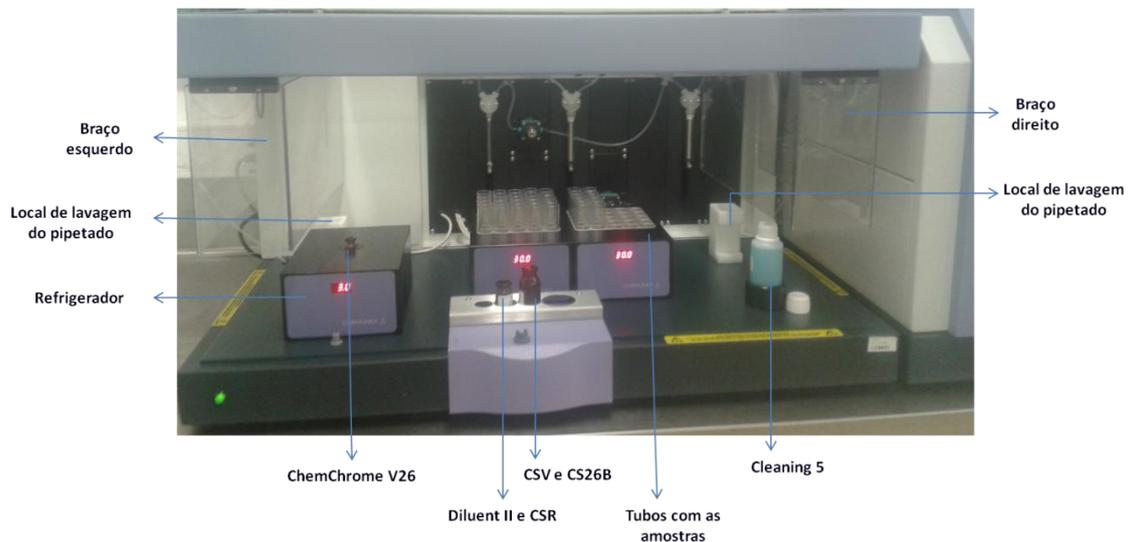


Figura 14 - Unidade de preparação de amostras (protocolo para águas)

Após o início da aplicação “A0511-02” para a análise das amostras, o D-Count® realiza uma série de passos para que seja possível a contagem microbiológica: distribuição de 20 μL de ChemChrome V26 e 1000 μL de ChemSol B26/1 em cada tubo; incubação a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos; distribuição de 110 μL da mistura de CSV e CS26B em cada tubo; incubação a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante mais 10 minutos; distribuição de 13 μL da solução redutora; homogeneização das amostras; e por fim injeção de 1 mL da amostra na célula de fluxo. O D-Count® analisa 500 μL da amostra injetada e, entre cada amostra, é injetado 800 μL de Cleaning

5 com o objetivo de limpeza para a não contaminação entre amostras. À medida que cada amostra é analisada os resultados vão aparecendo do ecrã do D-Count®.

1.4. Contagem em Placa

Todas as amostras analisadas no D-Count® foram analisadas em paralelo pela contagem em placa. Era incorporado 1 mL (em duplicado) de cada amostra em placas de Petri utilizando-se o meio *Plate Count Skim Milk Agar* (MPCA). Este meio permite a contagem da flora total presente em cada amostra. Após homogeneização e solidificação do meio com a amostra, incubaram-se as placas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 dias. Ao fim dos 3 dias, realizam-se as contagens das placas. Além destas placas era sempre colocada uma placa sem amostra que funcionava como controlo negativo.

2. Aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de *Bacillus cereus*

Nesta etapa do trabalho, foram analisadas amostras de *Bacillus cereus* pelo método de referência e pela citometria de fluxo. Além disso, contaminou-se leite estéril com *Bacillus cereus* e posteriormente analisou-se pelo método de contagem de placas e em paralelo pela citometria de fluxo. Todos os passos desta experiência estão divididos em diferentes partes para uma interpretação mais simples e direta.

2.1. Preparação da amostra

- 1ª Parte

Os laboratórios da Lactogal receberam 5 amostras de leite com *Bacillus cereus*, cedidas pela CecaLait com diferentes cargas microbianas. Visto que, as amostras chegaram congeladas, para não ocorrer um choque térmico as amostras foram inicialmente colocadas a uma temperatura de 10 °C e posteriormente à temperatura ambiente até ao descongelamento completo. Como não era possível saber a carga microbiológica que iria ser encontrada na amostra, foram feitas diluições em todas as amostras até um fator de 10000 (figura 12).

- 2ª Parte

Nesta etapa do trabalho já se tinham analisado as 5 amostras da Cecalait pelo D-Count® e pelo método de referência. E além disso era conhecida a carga microbiana das amostras, uma vez que, a CecaLait enviou os valores de referência de cada amostra.

Inicialmente foram esterilizados vários frascos de vidro, na autoclave para despistar possíveis contaminações. Após o arrefecimento dos frascos estéreis, na camara de fluxo, foi vertido um litro de leite estéril, em cada frasco. A cada um destes frascos foi retirado 10 mL de leite e além disso um dos frascos não foi contaminado, uma vez que, era necessário verificar que não houve contaminação por parte de outros fatores. Por fim, em cada frasco foi injetado 1

mL de *Bacillus cereus* da amostra 1 da CecaLait, sendo posteriormente colocados na estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48h.

- **3ª Parte**

Numa primeira etapa do trabalho, foi espalhado 1 mL de uma amostra da CecaLait no meio COMPASS® *Bacillus cereus* agar e posteriormente incubou-se a placa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 dia. Após 1 dia, retirou-se a placa da estufa, e na chama do bico de Bunsen (vizinhança da chama oferece condições assépticas), retirou-se uma colónia com a ajuda da ansa de repicagem previamente esterilizada. Pela técnica de riscado em meio sólido, foi contaminada uma nova placa, que foi posteriormente colocada na estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 dias.

Como o objetivo era a contaminação do leite para posterior análise, foram esterilizados vários frascos de vidro, na autoclave. Após o arrefecimento dos frascos estéreis, na camara de fluxo, foi vertido um litro de leite estéril, em cada frasco. A cada um destes frascos foi retirado 10 mL de leite e além disso um dos frascos não foi contaminado, uma vez que, era necessário verificar que não houve contaminação por parte de outros fatores. Por fim, em cada frasco foi colocado uma colónia com a ajuda de um pipetador esterilizado, sendo estes posteriormente colocados na estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48h.

2.2. Citometria de Fluxo – D-Count®

Em cada tubo do aparelho era colocado 500 µL de cada amostra, em triplicado e ainda mais dois tubos nos quais um vazio que funcionava como controlo negativo e um tubo com 100 µL de leite cru que funcionava como controlo positivo, dando um total de 50 tubos (um *Batch*).

Antes da realização de qualquer *Batch* no D-Count®, era sempre feita uma lavagem do equipamento utilizando o reagente ChemSol S e a posterior calibração com a adição do reagente Standard G. Além disso, era necessário a adição de 15 gotas de um agente estabilizante no frasco do esgoto de modo a evita a formação de espuma no mesmo. Como o equipamento contém dois pipetadores, um deles era mergulhado no ChemSol B26/1 e o outro pipetador no

Cleaning 5. Estes permitiam a lavagem e descontaminação entre as amostras analisadas. Foi necessária a preparação prévia de alguns reagentes: o CS26A e CS26B foram misturados e homogeneizados com o vortex e o reagente CSR foi misturado ao Diluent II, onde a essa mistura foi adicionado 15 gotas de Isored. Todos os reagentes e os 50 tubos foram colocados nas suas posições (figura 15) e o aparelho estava pronto para iniciar a análise das amostras.

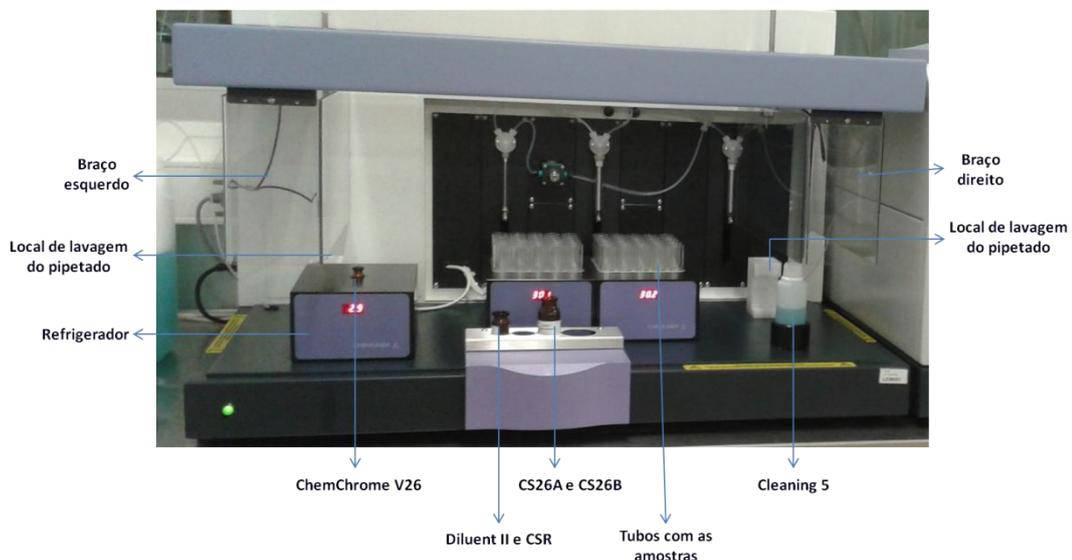


Figura 15 - Unidade de preparação de amostras (protocolo de leite estéril)

Após o início da aplicação “A0720-03” para a análise das amostras, o D-Count® realiza uma série de passos para que seja possível a contagem microbiológica: distribuição de 30 µL de ChemChrome V26 e 2215 µL de ChemSol B26/1 em cada tubo; homogeneização da amostra; incubação a 30 °C ± 2 °C durante 10 minutos; distribuição de 165 µL de CS26 (A+B) em cada tubo; incubação a 30 °C ± 2 °C durante mais 10 minutos; distribuição de 90 µL da solução redutora e homogeneização; novamente incubação durante 87 segundos; e por fim injeção de 700 µL da amostra na célula de fluxo. O D-Count® analisa 100 µL da amostra injetada e em cada amostra é injetado 1 mL de Cleaning 5 com o objetivo de limpeza para a não contaminação entre amostras. À medida que cada amostra é analisada os resultados vão aparecendo do ecrã do D-Count®.

2.3. Contagem em Placa

Todas as amostras analisadas no D-Count® foram analisadas em paralelo pela contagem em placa. O meio utilizado foi o COMPASS® *Bacillus cereus* agar, um meio que permite a detecção e enumeração de esporos e formas vegetativa de *Bacillus cereus* presentes em cada amostra. O substrato cromogénico incluído no meio de cultura é hidrolisado pelo *Bacillus cereus* e as colónias que se desenvolvem no meio apresentam uma coloração verde com um diâmetro superior a 1mm. A associação entre o substrato cromogénico e os agentes seletivos na formulação do meio COMPASS® *Bacillus cereus* agar permite uma enumeração direta das colónias depois de 24 horas de incubação. Este método para a contagens de *Bacillus cereus* foi certificado pela AFNOR e comparado com o método de referência NF EN ISO 7932 (Julho 2005). Comparado com outros métodos, apresenta algumas vantagens, tais como: detecção específica do grupo *cereus*; inibição de outras espécies de *Bacillus*, como *B. licheniformis* ou *B. subtilis*; inibição de bactérias Gram-positivas, bolores e leveduras; enumeração em apenas 24 horas; não necessita confirmação; e é necessário uma única placa, enquanto no método de referência são necessárias 2.

Era espalhado 1 mL (em duplicado) de cada amostra em placas de meio sólido, COMPASS® *Bacillus cereus* agar. Após o espalhamento da amostra, incubaram-se as placas a 30 °C ± 2 °C durante 1 dia. Ao fim de 1 dia, realizam-se as contagens das placas. Além destas placas era sempre colocada uma placa com amostras de leite sem *Bacillus cereus* que funcionava como controlo negativo.

3. Aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de *Escherichia coli*

Nesta etapa do trabalho, foi injetada *E. coli* em leite esterilizado, sendo este posteriormente analisado pelo D-Count® e em paralelo pelo método de referência, com o objetivo de validar o equipamento D-Count® para a quantificação de *E. coli*.

Assim, inicialmente foram esterilizados vários frascos de vidro, na autoclave para despistar possíveis contaminações. Após o arrefecimento dos frascos estéreis, na câmara de fluxo, foi vertido um litro de leite estéril, em cada frasco. A cada um destes frascos foi retirado 10 mL de leite e além disso um dos frascos não foi contaminado, uma vez que, era necessário verificar que não houve contaminação por parte de outros fatores. Por fim, em cada frasco foi injetado 10 µL de *E. coli* de cultura pura, sendo posteriormente colocados na estufa a 30 °C ± 2 °C. O tempo de incubação foi diferente para cada amostra, visto que houve frascos analisados após duas horas de incubação, outros após 3 horas, 4 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas.

Quando retiradas da estufa, as amostras, antes de serem analisadas, foram sujeitas a diluições, uma vez que, não era possível saber a carga microbológica que iria ser encontrada. O método utilizado para as diluições foi o descrito no ponto 1.3 do capítulo “Materiais e Metodologias” e por norma, as amostras foram diluídas até um fator de 1000.

Todas as amostras e respectivas diluições foram analisadas pelo D-Count® utilizando os mesmos princípios descritos no ponto 2.2 do capítulo “Materiais e Metodologias”. Essas mesmas amostras foram analisadas em paralelo pela contagem em placa. Era incorporado 1 mL (em duplicado) de cada amostra em placas de Petri utilizando-se o meio *Violet Red Bile Agar* (VRBA) e em placas de Petri utilizando-se o meio *Plate Count Skim Milk Agar* (MPCA). O meio VRBA permite a contagem dos coliformes presentes em cada amostra, enquanto o meio MPCA permite a contagem da flora total. Após homogeneização e solidificação do meio com a amostra, incubaram-se as placas a 30 °C durante 3 dias. Ao fim dos 3 dias, realizam-se as contagens das placas. Além destas placas eram sempre colocadas placas com amostras de leite sem *E. coli* que funcionava como controlo negativo.

III- Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os principais resultados obtidos com a realização do presente trabalho e a discussão pormenorizada dos mesmos.

Este capítulo está dividido em três partes: aplicação da citometria de fluxo na avaliação higiénica de superfícies; aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de *Bacillus cereus*; e aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de *Escherichia coli*. A divisão foi realizada por uma questão de interpretação mais simples e direta.

1. Aplicação da citometria de fluxo na avaliação higiénica de superfícies

A Lactogal apresenta planos de controlo de higiene de equipamentos/ materiais que devem ser efetuados mensalmente através do método da zaragatoa. Estes planos englobam a análise a camiões cisternas, linhas de receção e expedição de leite e nata, tanques de leite cru, tanques de leite termizado, tanques de nata termizada e pasteurizada, tanques de leites compostos, mãos dos operadores, sala de enchimento (piso/ralos de enchimento) e pediluve (tapete de higienização dos pés à entrada). Além deste controlo obrigatório em situações esporádicas pode ser necessário realizar um controlo extra. Um bom exemplo disto é a análise de camiões cisternas que transportam leite da Lactogal para outros locais. Uma vez que, estes camiões não pertencem a Lactogal, podem não ter sido sujeito a uma limpeza e desinfeção adequadas levando a uma possível contaminação do leite transportado. Assim, é efetuado um controlo de higiene para garantir que o camião esteja em perfeitas condições para transportar o leite. No entanto, devido a este controlo ser realizado pelo método da zaragatoa e posteriormente analisado pela contagem padrão em placa, os resultados só serão conhecidos três dias depois, tornando-se assim impossível a espera.

Atualmente, a lactogal, utiliza o D-Count® (equipamento de citometria de fluxo) para a quantificação de microrganismos, ou seja, para avaliar a qualidade do leite. No entanto, este poderia também ser utilizado para o controlo de higiene dos equipamentos/matérias, com o uso de uma nova aplicação e novos reagentes. Assim sendo, seria possível ultrapassar a espera de três dias para o conhecimento dos resultados devido ao D-Count® fornecer os resultados no mesmo dia.

Com o objetivo de validar o método da citometria de fluxo para a avaliação higiénica de superfícies, neste primeiro trabalho fez-se uma comparação entre a citometria de fluxo e o método de referência (contagem padrão em placas). Para isso foram analisadas diferentes amostras pelos dois métodos em paralelo.

De modo a obter uma relação entre os dois métodos foram analisadas superfícies limpas e superfícies sujas e mãos limpas e mãos sujas, com o objetivo de obter uma vasta faixa de resultados. Assim sendo, neste trabalho foram analisadas desde superfícies com menos de 10 CIB/cm² até superfícies com mais de 100000 CIB/cm².

A relação entre os resultados das contagens microbiológicas obtidas pelo D-Count® e pelo método de referência pode ser observada na figura 16. Considerando os resultados das 34

amostras a equação obtida foi $\text{Log (UFC/cm}^2\text{)}=1,0189\times\text{Log (CIB/cm}^2\text{)} - 0,5123$ e o coeficiente de correlação (R^2) estimado entre os diferentes métodos foi de 0,92. Comparando com dados recolhidos na literatura é possível dizer que este valor representa um alto grau de associação entre os dois métodos analisados (Gunasekera et al., 1999; Holm et al., 2004; CASSOLI et al, 2007; Flinta et al., 2006). Além disso, encontra-se dentro dos limites esperados, uma vez que, estudos realizados em vários países mostraram que os valores de correlação entre o método de referência e a citometria de fluxo variam entre 0,90 e 0,98 (Broutin, 2004).

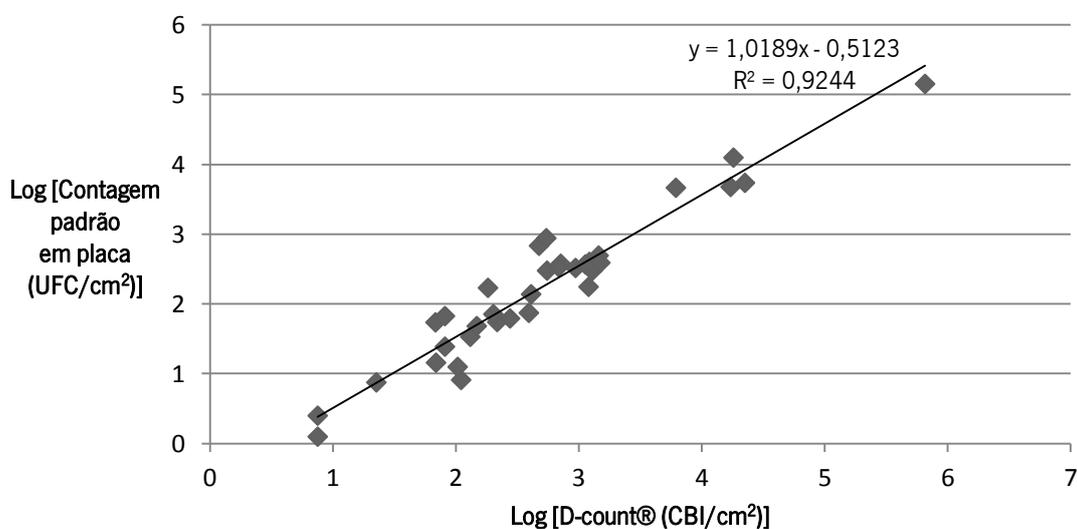


Figura 16 - Correlação entre a contagem microbiana total obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa

Apesar de neste caso a correlação entre os dois métodos ser aceitável, é essencial referir a importância da utilização de um grande número de amostras neste género de estudos, uma vez que, vários fatores podem interferir nos resultados. Dos fatores, os que se destacam são o nível de contaminação microbiana, a atividade metabólica das células bacterianas, as características de agregação das células bem como a microbiota predominante (Evangelista, 2008; Holm et al., 2004). Obviamente, que ambos os métodos são apenas estimativas do número real de bactérias e quando se compara o método de citometria de fluxo com o método de referência contar em plena conformidade não é necessariamente um requisito.

Para cerca de 94% das amostras as contagens realizadas pelo D-Count® foram superiores às contagens obtidas pelo método de referência. Em média, as contagens pelo D-Count® foram 3,55 vezes maiores do que na contagem padrão em placa. Nas restantes 6%, que

apenas englobava 2 amostras, o caso inverteu-se e a contagem padrão em placa foi, em média, 1,53 vezes maior do que a citometria de fluxo.

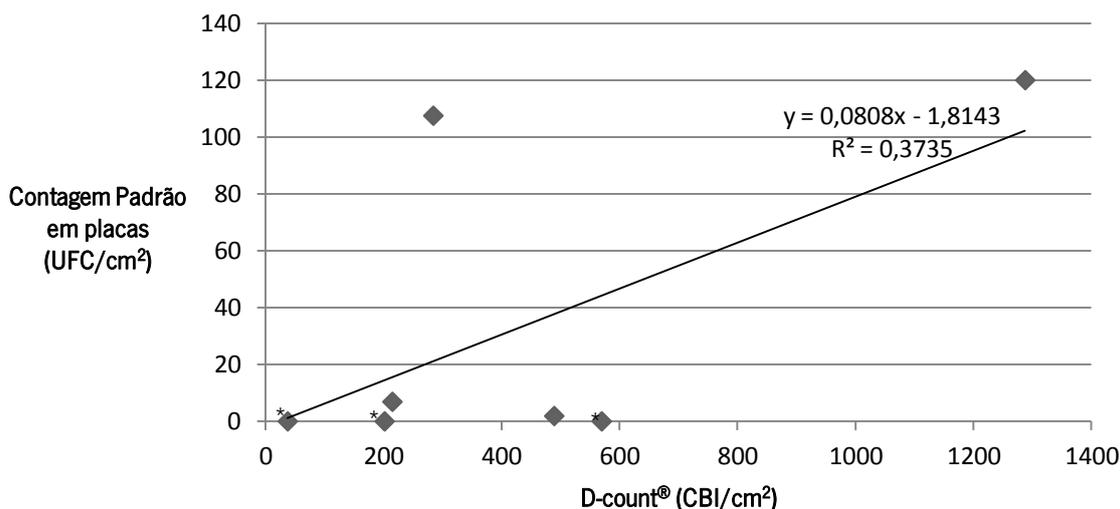
Como já foi dito anteriormente, a contagem padrão em placa apenas conta colônias, subestimando assim a quantidade total de bactérias presentes no leite, uma vez que, uma colônia pode ser constituída por apenas uma bactéria ou por um agregado de bactérias. Além disso, somente vão ser detetados os microrganismos capazes de se desenvolver nas condições específicas do meio (nutrientes, disponibilidade de oxigênio, tempo/temperatura incubação). Outro aspeto importante é o facto do método de referência ser capaz de enumerar células viáveis mas incapaz de enumerar células viáveis não cultiváveis. Por outro lado, o D-Count® fornece os resultados em contagem individual de bactérias, ou seja, os resultados são mais precisos e reais. Além disso, o D-Count® enumera a contagem total, ou seja as bactérias viáveis, incluindo também as bactérias viáveis mas não cultiváveis. Assim sendo, a contagem microbiana total pelo método de referência normalmente é sempre inferior à contagem realizada por equipamentos de citometria de fluxo.

Em conclusão, é possível afirmar que o D-Count®, para esta aplicação, pode ser utilizado como um método alternativo para a contagem padrão em placa, dado que apresenta um coeficiente de correlação alto, indicando assim um alto grau de associação entre os dois métodos.

A água da torneira também foi analisada pelo D-count® e pelo método de referência, nesta etapa do trabalho. No entanto, como é possível observar na figura 17 os resultados não foram muito satisfatórios. As contagens do D-Count® foram em todas as amostras superiores às contagens do método de referência, como era de esperar, porém a correlação obtida foi de 0,3735, concluindo-se assim que não existe um grau de associação entre os dois métodos.

A água da torneira deveria dar contagens baixas ou até nulas, o que acontece com as contagens apresentadas pelo método de referência. No entanto, existem duas amostras com contagens pelo método de referência, muito superiores às restantes, e isso deveu-se ao facto de essas mesmas amostras terem sido recolhidas de uma torneira muito pouco utilizada.

Assim, é possível concluir que o D-Count® não pode ser validado para a verificação da qualidade da água, visto que os resultados desta experiência foram inconclusivos.



*contagens em placa inferiores a 1 UFC/cm² foram consideradas iguais a zero, para efeitos gráficos

Figura 17 - Correlação entre a contagem microbiana total, da água da torneira, obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa

Uma vez que, neste trabalho o objetivo era apenas a validação do método de citometria de fluxo, o facto de as contagens das superfícies limpas estarem ou não dentro dos limites estabelecidos (tabela 3) não foi uma preocupação, por isso mesmo não houve uma análise nesse sentido. No entanto é importante referir que estes limites são cumpridos, pela Lactogal, quando é realizado o plano de higiene dos equipamentos/equipamentos ou em qualquer outra análise extra que seja realizada.

Tabela 3 - Limites estabelecidos pela Lactogal

Nº de colónias coliformes/dm ²		Nº de bactérias aeróbias mesófilas/dm ²		Nº de bolores e leveduras/dm ²	
<10	Conforme	<10	Conforme	<10	Conforme
≥10	Não Conforme	≥10	Não Conforme	≥10	Não conforme

2. Aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de *Bacillus Cereus*

Como foi referido anteriormente, *Bacillus cereus* é um dos microrganismos de maior importância na indústria dos laticínios, uma vez que, a sua presença leva a deterioração do leite podendo causar intoxicações alimentares a quem o vai consumir. A sua presença pode dever-se tanto à resistência do microrganismo ao tratamento térmico, pois, é capaz de produzir toxinas, como à contaminação do alimento pós-processamento, devido a capacidade de adesão e de formação de biofilmes nas superfícies dos equipamentos utilizados para o processamento do leite.

Sendo, o *Bacillus cereus*, de grande importância na indústria dos laticínios e uma vez que a Lactogal compromete-se a colocar no mercado apenas produtos com qualidade, são necessários métodos para a quantificação deste microrganismo. O método de referência para a quantificação de microrganismos é a contagem padrão em placa, no entanto, como já foi dito anteriormente é um método muito moroso, o que leva a grandes intervalos de espera. Visto que a Lactogal já tinha adquirido um equipamento para a quantificação de microrganismos, que permite ultrapassar essas esperas, seria uma mais valia perceber se o equipamento pode ser utilizado para a quantificação deste microrganismo em particular. Assim, nesta etapa do trabalho foram analisadas 5 amostras contendo apenas *Bacillus cereus*, fornecidas pela CecaLait, pelo método de referência e pelo D-Count® com o objetivo de validar o equipamento D-Count® na quantificação de *Bacillus cereus*.

De modo a satisfazer um dos objetivos deste trabalho, verificou-se a correlação entre o D-Count® e o método de referência, que pode ser observada na figura 18.

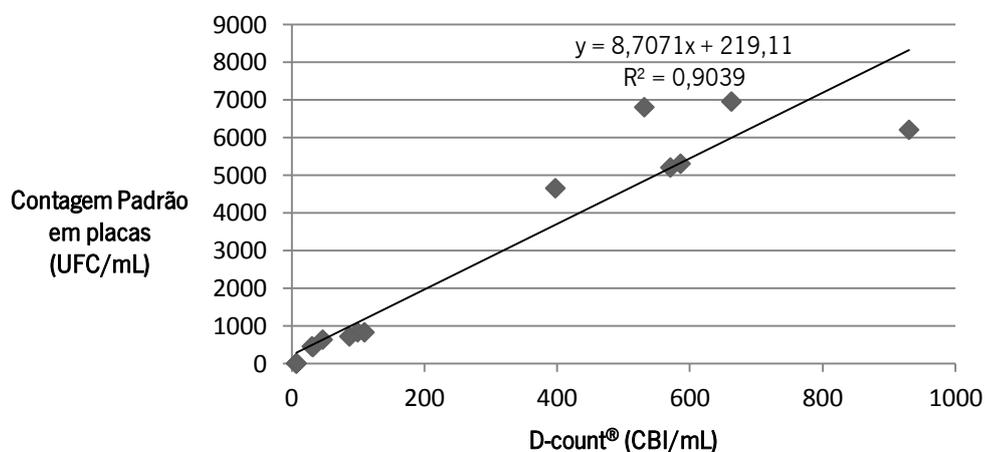


Figura 18 - Correlação entre a contagem microbiana total, das diferentes amostras, obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa

Considerando os resultados das 5 amostras analisadas, a equação obtida foi $\text{Log (UFC/mL)}=8,7071 \times \text{Log (CIB/mL)}+ 219,11$ e o coeficiente de correlação (R) estimado entre os diferentes métodos foi de 0,9039. Quando analisado o coeficiente de correlação é possível dizer que existe uma alta associação entre os dois métodos, além disso, o valor de R quando comparando com dados recolhidos na literatura encontra-se dentro do intervalo esperado, uma vez que, estudos realizados mostraram que os valores de correlação entre o método de referência e a citometria de fluxo variam entre 0,90 e 0,98 (Broutin, 2004; Gunasekera et al., 1999; Holm et al., 2004; CASSOLI et al, 2007; Flinta et al., 2006).

Uma vez que, era conhecida a carga microbiana das amostras, inicialmente as amostras foram apenas analisadas pelo D-Count®, no entanto, os valores das contagens do D-Count® não correspondiam aos valores de referência. Assim, de modo a perceber se o problema estaria nas amostras, estas foram analisadas pelo método de referência com um meio apropriado para a contagem de *Bacillus cereus*. Os resultados obtidos pelos diferentes métodos e os valores reais das amostras, ou seja os valores de referência de cada amostra são apresentados de forma mais simplificada na tabela 4.

Tabela 4 - Média das contagens do D-Count® e das contagens em placa das diferentes amostras, fornecidas pela CecaLait, e respectivos valores de referência.

Amostra	Média Contagens D-Count® (CIB/mL)	Média Contagens em Placas (UFC/mL)	Valor referência (CIB/mL)
1	7	<1	10
2	40	505	500
3	518	5050	5217
4	708	6650	7430
5	98	788	939

Como é possível observar na tabela 4, o D-Count® apresenta contagens cerca de dez vezes inferiores aos valores de referência. O único valor apresentado pelo D-Count® que se aproxima do valor real é o da amostra 1, já que a amostra apresentada uma carga microbiana de 10 CIB/mL e as contagens do D-Count®, em média, apresentaram contagens de 7 CIB/mL. Isto deve-se ao facto do aparelho ser mais preciso em contagens alta e menos preciso em contagens mais baixas. Quanto às contagens obtidas pela contagem padrão em placas são

bastante idênticas aos valores de referência (tabela 4), ou seja, é possível concluir que as amostras estavam em perfeitas condições e que o D-Count® não foi capaz de quantificar as amostras.

Não sendo encontrada qualquer explicação para a diferença de resultados entre o D-Count® e o método de referência, foi colocada a questão à bioMérieux, a fornecedora do equipamento. Até à realização deste trabalho não foi obtida uma resposta muito clara, no entanto a não incubação das amostras, como pede o protocolo do D-Count®, foi um dos pontos referidos.

De modo a perceber se a incubação das amostras traria qualquer diferença de resultados, foi inoculado 1 mL da amostra 1 num litro de leite, sendo este leite colocado numa estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, para posterior análise pelo método de referência e pelo D-Count®. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5 - Contagens do D-Count® e contagens em placa, com respetivas médias, das amostras contaminadas com *Bacillus cereus*

Amostra	D-Count®			Contagem em Placas			
	CIB / mL		Média	UFC / mL		Média	
Leite contaminado com <i>Bacillus cereus</i> ^a	1902	1782	2498	2061 ^b	<1	1	<1
	1305	1305	-	1305 ^b	<1	<1	<1
	1518	1468	1530	1505 ^b	<1	<1	<1
	21460	22460	20800	21573 ^c	1	<1	<1
	3920	4471	4614	4335 ^c	<1	<1	<1
	42800	38800	44800	42133 ^c	1	<1	<1
Leite antes da contaminação com <i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0 ^b	<1	<1	<1
	10	0	10	7 ^b	<1	<1	<1
	0	0	10	3 ^b	<1	<1	<1
	10	0	20	10 ^c	<1	<1	<1
	0	10	10	7 ^c	<1	<1	<1
	0	0	0	0 ^c	<1	<1	<1

^a 1 L de leite inoculado com 1 mL de *Bacillus cereus* da amostra 1 (10 CIB/mL); ^b leite utilizado para análise diretamente do pacote; ^c leite utilizado para análise antes de contaminado foi à autoclave

III- Resultados e Discussão

Ao contrário do que aconteceu anteriormente, as contagens do D-Count® foram superiores às contagens do método de referência, no entanto não houve uma correlação visível entre os dois métodos uma vez que, em todas as amostras, as contagens do aparelho foram relativamente altas e as contagens das placas foram praticamente nulas.

Antes do leite ser contaminado com *Bacillus cereus* foram retiradas pequenas amostras desse mesmo leite para posterior análise, com o objetivo de verificar se o leite não estava contaminado antes de ser inoculado com *Bacillus cereus*. Além disso, em alguns casos, o leite, antes de contaminado, ainda foi à autoclave de modo a garantir a máxima esterilidade do leite. Como é possível observar na tabela 5, as contagens, tanto do D-Count® como da contagem em placas, provam que o leite, diretamente do pacote e o leite que foi anteriormente à autoclave, estava estéril.

Visto que o leite não se encontrava contaminado, que os frascos utilizados para a inoculação tinham sido esterilizados antes, que todo o trabalho tinha sido realizado numa câmara de fluxo e que o mililitro inoculado só apresentava *Bacillus cereus* seria quase impossível ocorrer uma contaminação por parte de outro microrganismo. Assim sendo, seria de esperar que as placas tivessem contagens positivas, uma vez que, o leite só deveria estar contaminado com *Bacillus cereus*.

Como tinha sido anteriormente provado que as placas utilizadas para a contagem deste microrganismo estavam em concordância com os valores de referência, não seria de esperar que houvesse algum problema com estas. Por não encontrar quaisquer explicações para os resultados obtidos e por a validade das placas estar próximo de expirar, foi analisada mais uma vez a amostra 2, fornecida pela CecaLait, com o objetivo de garantir que as placas ainda se encontravam em condições de utilização. Foram apenas feitas duas análises e os resultados podem ser vistos na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados das contagens do D-Count® e das contagens em placa da amostra 2, fornecida pela CecaLait.

Amostra	D-Count®			Contagem em Placas			
	CIB / mL			Média	UFC / mL		Média
2	30	35	30	32	2	2	2
	57	49	55	54	1	0	1

Os resultados do D-Count® foram bastante idênticos aos resultados que tinham sido obtidos anteriormente (tabela 4), no entanto, as contagens em placas foram quase nulas, o que levou a concluir que as placas utilizadas não estariam em perfeitas condições.

Apesar das placas não se apresentarem em condições, as poucas colónias que cresceram eram *Bacillus cereus*, uma vez que, as colónias apresentavam uma cor esverdeada e um diâmetro superior a 1mm. Assim, retirou-se uma colónia de *Bacillus cereus* e pela técnica de riscado em meio sólido, foi inoculada uma nova placa, de um lote diferente.

Sendo o objetivo do trabalho a contaminação do leite apenas com *Bacillus cereus*, para eliminar possíveis fontes de contaminação, não foram utilizadas as amostras enviadas pela CecaLait, mas sim as colónias que cresceram na nova placa contaminada. Ou seja, em cada frasco com um litro de leite foi colocada uma colónia, sendo estes posteriormente colocados na estufa a $30 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h. Após 48 h de incubação, o leite contaminado foi analisado pelo método de referência e pelo D-count®, com o objetivo de validar o equipamento para a quantificação de *Bacillus cereus* e perceber se a incubação do leite antes de ser analisado teria alguma influência sobre os resultados obtidos.

Os resultados e a correlação entre os dois métodos podem ser observados na figura 19.

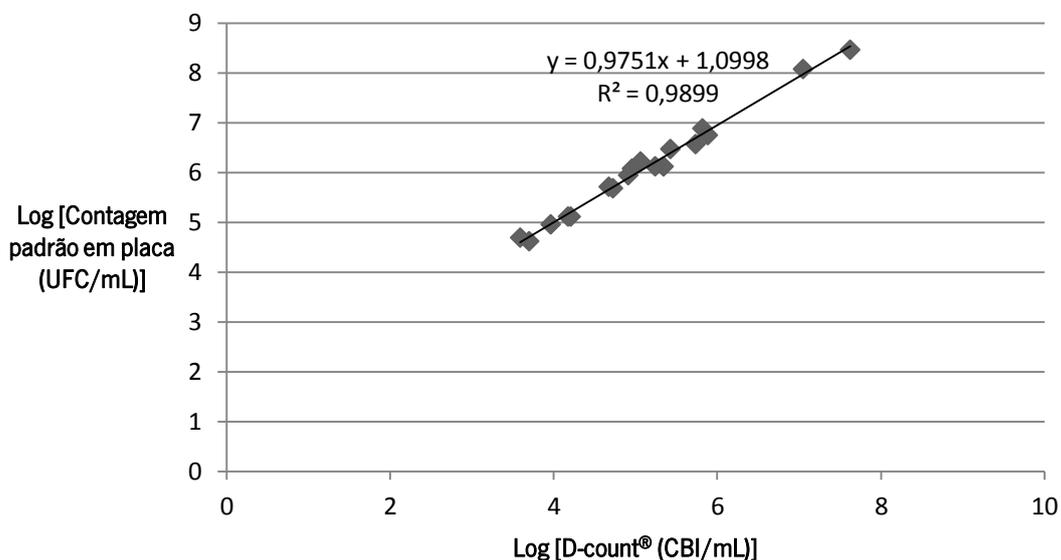


Figura 19 - Correlação entre a contagem microbiana total obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa na quantificação de *Bacillus cereus*

Considerando os resultados das amostras, a equação obtida foi $\text{Log (UFC/mL)}=9,751 \times \text{Log (CIB/mL)}+ 1,0998$ e o coeficiente de correlação (R^2) estimado entre os diferentes métodos foi de 0,9899. Mais uma vez, quando analisado o coeficiente de correlação é possível dizer que existe uma alta associação entre os dois métodos, e além disso, o valor de R^2 encontra-se dentro do intervalo esperado. (Broutin, 2004; Gunasekera et al., 1999; Holm et al., 2004; CASSOLI et al., 2007; Flinta et al., 2006).

Apesar da alta correlação entre os dois métodos, os valores obtidos não foram os esperados, visto que, as contagens pelo D-Count® não foram superiores às contagens do método de referência. Como já foi dito anteriormente, deveria acontecer o contrário, uma vez que, a contagem padrão em placa apenas conta colônias, subestimando assim a quantidade total de bactérias presentes no leite, enquanto o D-Count® fornece os resultados em contagem individual de bactérias. Além disso, o método de referência é apenas capaz de enumerar células viáveis mas incapaz de enumerar células viáveis não cultiváveis, ou seja, mais uma vez, o método pode ser descrito como insuficiente, uma vez que, células lesadas devido a tratamentos térmicos apesar de serem não cultiváveis podem manter a sua atividade metabólica, permanecendo viáveis, podendo mais tarde vir a crescer em alimentos processados. Já o D-Count® é capaz de enumerar células viáveis, incluindo também as células viáveis mas não cultiváveis. Assim sendo, a contagem microbiana total pelo método de referência normalmente é sempre inferior à contagem realizada por equipamentos de citometria de fluxo.

Neste caso, o D-count® não correspondeu as expectativas e apresentou contagens cerca de 10 vezes inferiores às contagens pelo método de referência. Apesar de este não ser o resultado esperado, existe um padrão relativo às contagens dos dois métodos. Tanto no início desta experiência, onde foram utilizadas amostras enviadas pela CecaLait, como nesta etapa, onde foram incubadas amostras com *Bacillus cereus*, que os valores do D-count® foram 10 vezes inferiores. Não existe uma conclusão concreta para esta diferença de resultados, no entanto é possível afirmar que a incubação das amostras não trouxe qualquer diferença de resultados entre os dois métodos, apenas contagens superiores.

Dado que, o protocolo usado no D-count® é um método qualitativo (semi - quantitativo), o fundamental é obter o mesmo resultado pelos dois métodos, ou seja, se os resultados do D-count® forem positivos, os resultados das placas também devem ser positivos, se por outro lado, os resultados do D-count® forem negativos, os resultados das placas também devem ser

negativos. É de lembrar que o D-count® considera um resultado positivo aquele que for superior a 150 CIB/mL

É evidente que pelos resultados obtidos, é possível concluir que o D-count® não quantifica na totalidade o *Bacillus cereus*, pois como vimos os valores do D-count® são cerca de 10 vezes mais baixos do que os valores obtidos pela contagem padrão em placa, ou seja, o equipamento não apresenta o valor real presente no leite. No entanto, pelas amostras analisadas, onde a quantidade inicial de *Bacillus cereus* era mínima, é possível verificar que após 48 h de incubação, o crescimento foi de tal maneira elevado que o D-count®, apesar de não apresentar o valor real da amostra, apresenta valores muito elevado, ou seja, positivos.

Na Lactogal, o leite antes de ser analisado pelo equipamento é colocado a incubar durante no mínimo 3 dias. Se o leite estiver contaminado com *Bacillus cereus*, estes três dias são mais que suficientes para o crescimento deste microrganismo até valores muito elevados. Assim sendo, é possível concluir que o D-count® apesar de não ser capaz de quantificar este microrganismo, é capaz de qualificar a qualidade do leite, levando a resultados positivos (≥ 150 CIB/mL).

3. Aplicação da citometria de fluxo na pesquisa de *Escherichia coli*

Atualmente, a Lactogal, utiliza o D-Count® para a quantificação de microrganismos, ou seja, para avaliar a qualidade do leite. No entanto, é importante perceber se este aparelho é capaz de contabilizar a *Escherichia coli* quando esta está presente no leite devido a uma contaminação. Obviamente que a quantificação deste microrganismo pode ser realizada através do método de referência, mas como dito anteriormente a utilização deste método necessita de uma espera de três dias para o conhecimento dos resultados. Assim sendo, de modo a serem ultrapassadas estas demoradas esperas e de obter resultados quase no momento seria importante para a Lactogal optar por um método mais rápido como a citometria de fluxo (D-Count®).

Todas as novas tecnologias implementadas, como o D-Count®, devem ser correlacionadas com o método de referência, por isso mesmo, como um dos objetivos deste trabalho era a validação do método da citometria de fluxo para a pesquisa de *Escherichia coli*, procedeu-se a uma comparação entre a citometria de fluxo e a contagem padrão em placas. Para isso foram analisadas diferentes amostras pelos dois métodos em paralelo.

Para o método de referência foram utilizados dois meios: o MPCA, que permite a contagem da flora total e o VRBA, que permite a contagem dos coliformes presentes na amostra. Uma vez que, o leite contaminado com *E. coli* estava estéril as contagens feitas nos diferentes meios da mesma amostra deveriam ser iguais. Por isso, construiu-se um gráfico de barras (figura 20) para uma mais fácil visualização da diferença de resultados entre os dois meios.

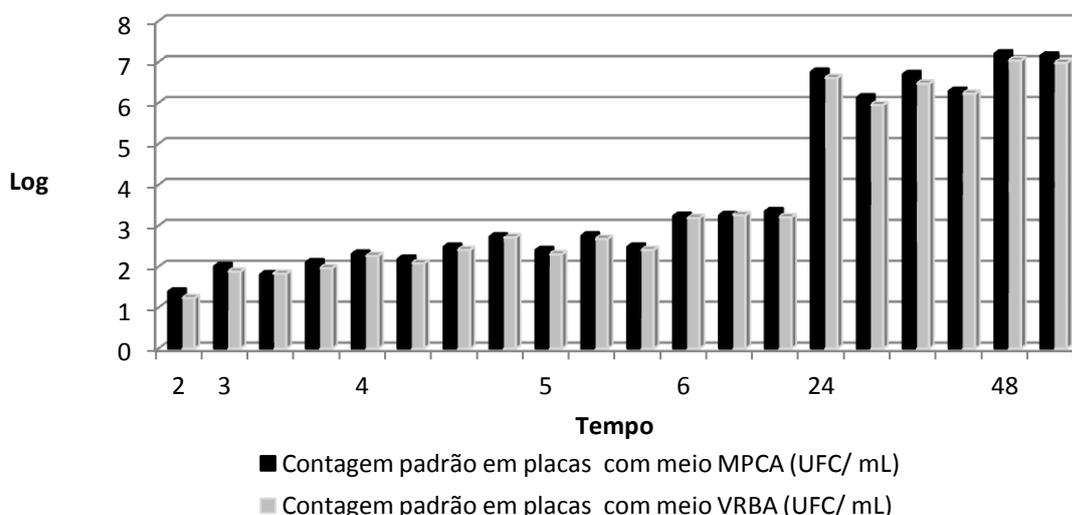


Figura 20 – Diferença entre as contagens microbianas totais obtidas pelo método de contagem padrão em placa com meio MPCA e as contagens de coliformes obtidas pelo método de contagem padrão em placa com meio VRBA.

Como é possível observar na figura 20, as contagens entre os dois métodos é idêntica, sendo que as contagens em placas com meio MPCA foram cerca de 1,3 vezes maiores do que as contagens em placa com meio VRBA. Como era de esperar, as contagens deveriam ser muito idênticas, uma vez que, o leite apenas apresentava *E. coli*. No entanto, estas contagens nunca poderiam ser iguais, pois o método de contagem em placas não é um método 100% preciso.

Para uma melhor observação da semelhança dos resultados foi traçada uma reta onde é possível verificar a correlação entre a contagem microbiana obtida pelo método de contagem padrão em placa com meio MPCA e a contagem de coliformes obtida pelo método de contagem padrão em placa com meio VRBA (figura 21). Considerando os resultados das 20 amostras, o coeficiente de correlação (R^2) estimado entre os diferentes métodos foi de 0,9992, aproximadamente 1, ou seja, existe um elevadíssimo grau de associação entre os dois meios analisados. Quanto à equação obtida entre a relação dos diferentes resultados foi $\text{Log [VRBA(UFC/mL)]} = 0,9825 \times \text{Log [MPCA(UFC/mL)]} - 0,039$. Obviamente que os resultados seriam iguais se a equação fosse do género $y=x$ (reta a tracejado no gráfico), ou seja, $\text{Log [VRBA(UFC/mL)]} = \text{Log [MPCA(UFC/mL)]}$, o que não acontece. Mas mais uma vez é possível realçar a enorme semelhança dos resultados, uma vez que, todos os valores encontram-se muito próximos da reta a tracejado e além disso, se a ordenada na origem e o declive, 0,039 e 0,9825, respetivamente, forem arredondados à unidade a equação fica do género $y=x$.

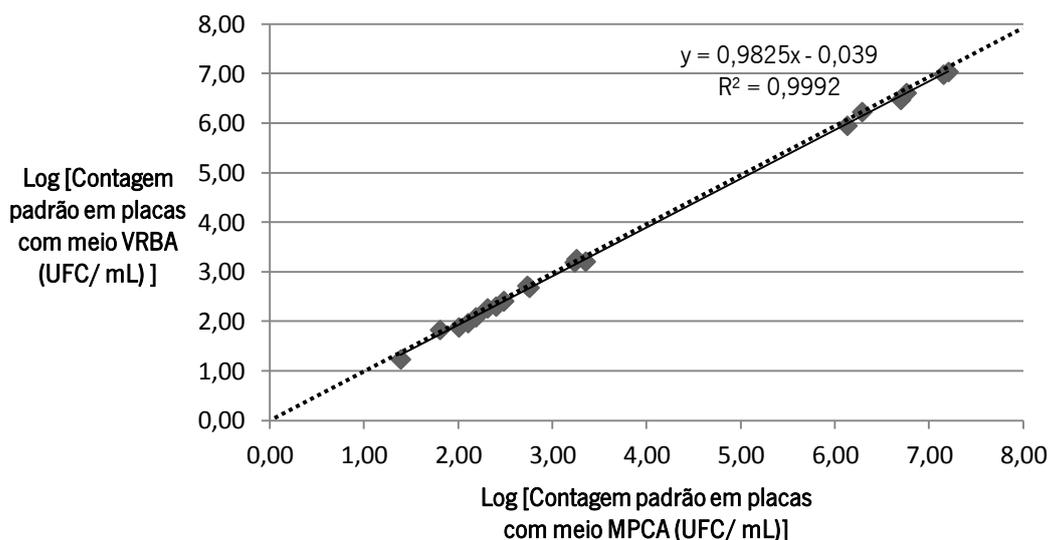


Figura 21 - Correlação entre a contagem microbiana total obtida pelo método de contagem padrão em placa com meio MPCA e a contagem de coliformes obtida pelo método de contagem padrão em placa com meio VRBA.

III- Resultados e Discussão

Devido à semelhança entre as contagens dos dois métodos foram apenas utilizados os valores obtidos num meio para a comparação com o D-Count®, sendo esse o meio MPCA. Além disso, a escolha recaiu sobre este meio, uma vez que, o meio MPCA é utilizado para contagens da flora total presente na amostra, tal como o D-Count®. Assim, todos os resultados que se seguem são resultado das contagens de placas com meio MPCA.

Sendo o objetivo deste trabalho a validação do aparelho D-Count® na deteção de *E. coli*, foi injetado uma quantidade mínima deste microrganismo em pacotes de leite estéril e posteriormente recorreu-se a análise destas amostras pelo D-Count® e em paralelo pelo método de referência. Outro dos objetivos seria perceber ao fim de quanto tempo poderia ser detetada a *E. coli* no leite, por isso as amostras foram analisadas após 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h e 48 h de incubação a 30 °C. Os resultados obtidos ao longo do tempo pelo método de referência e pelo D-Count® podem ser observados na figura 22.

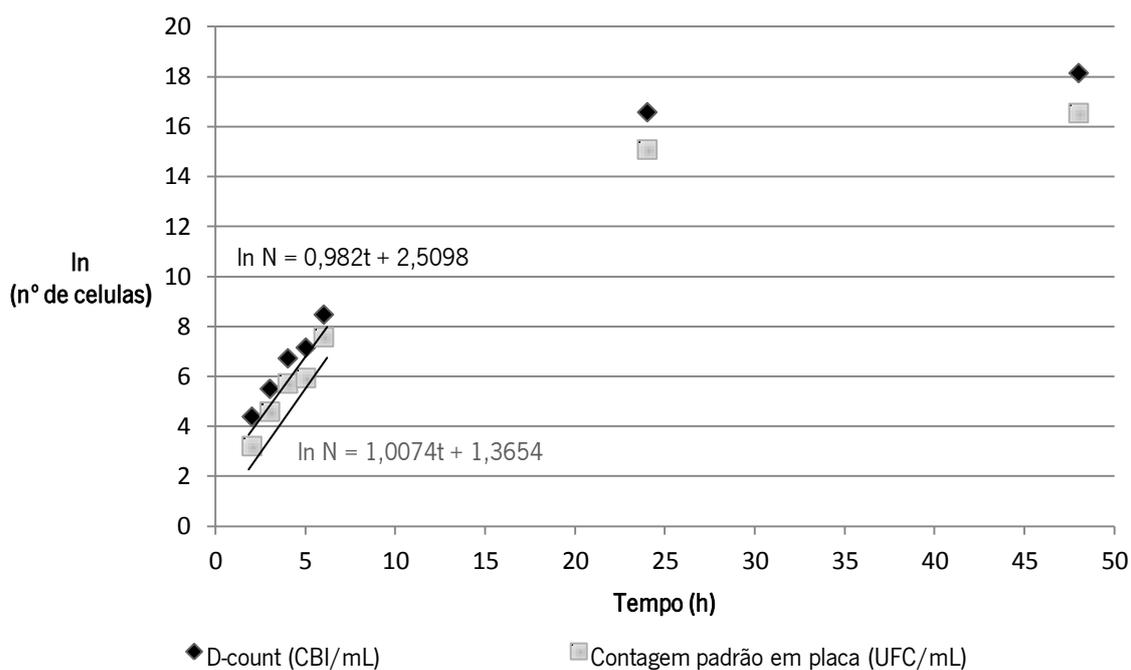


Figura 22 - Curva de crescimento da *Escheriachia coli*

Uma única célula da bactéria *E. coli* pode, em circunstâncias ideais, dividir-se de 20 em 20 minutos. Este cenário pode não parecer assim tão desastroso mas o facto é que a bactéria multiplica-se geometricamente, ou seja, uma transforma-se em duas, duas em quatro, quatro

em oito e assim sucessivamente. Ao fim de 20 gerações é possível ter 1 milhão de células a partir de uma única célula. Obviamente que este crescimento só pode ser mantido se houver nutrientes ilimitados, inalterações no ambiente e espaço limitado. No entanto quando a população de células microbianas é colocada num sistema fechado, como acontece no caso desta experiência, algum fator se torna desfavorável e o crescimento da população acaba por cessar. Normalmente, um ou mais nutrientes tornam-se limitantes e/ou ocorre a acumulação de metabolitos que inibem o crescimento ou o espaço torna-se ilimitado.

Na curva de crescimento de microrganismos típica, representada anteriormente (figura 7), podem ser observadas quatro fases distintas: a fase lag, a fase exponencial, a fase estacionária e a fase de declínio. No entanto, a curva obtida pelos resultados experimentais (figura 22) não é semelhante na sua totalidade à curva de crescimento típica, ou seja, na curva da figura 22 apenas é possível observar uma fase, a fase exponencial. Como um dos objetivos deste trabalho era perceber com quanto tempo de incubação era detetada a presença de *E. coli* no leite pelo equipamento D-Count®, as amostras apenas foram analisadas em algumas horas de incubação, levando a uma curva de crescimento mais incompleta. Uma vez que, o D-Count® considera amostras contaminadas aquelas com contagens superiores a 150 CIB/mL é possível concluir que amostras contaminadas com *E. coli* podem ser detetadas pelo D-Count® com pelo menos 4 h de incubação.

Através da curva experimental é possível obter os valores da taxa específica de crescimento e do tempo de duplicação, que vão ser comentados em seguida. Além disso, é possível saber uma estimativa do valor inicial, no tempo zero, de *E. coli* presente na amostra, uma vez que, a ordenada na origem das retas apresentadas na figura 22 é igual ao $\ln N_0$ (equação 4 – capítulo 1, ponto 3.2). Assim, o valor de N_0 no caso do D-Count® foi de 12 CIB/mL, enquanto no caso do método de referência o valor foi de aproximadamente 4 UFC/mL. Visto que, foram comparados dois métodos distintos analisando a mesma amostra, o valor da concentração inicial (N_0) deveria ser idêntico nos dois métodos, mas sendo os valores dados pelas retas uma estimativa e sendo as contagens do D-Count® normalmente superiores às contagens do método de referência, os valores de N_0 não são iguais.

Como já foi referido, a primeira fase é uma fase de adaptação metabólica das células ao novo ambiente onde o número de indivíduos não aumenta. Pela análise da figura 22 é possível concluir que a duração desta fase foi inferior a duas horas. Obviamente que para captar a fase

lag era necessário uma análise às amostras com tempos de incubação inferiores a duas horas (Assis, 2007; Rodrigues, 2002; Lengeler, et al. 1999).

Visto que a análise foi realizada após duas horas de incubação é impossível concluir com toda a certeza que a fase exponencial começou nesse instante, no entanto é possível observar um aumento exponencial do número de células desde as duas horas de incubação até as seis horas de incubação. Assim, é possível concluir que as células iniciaram o seu processo de multiplicação, atingindo-se assim durante estas quatro horas a fase exponencial de crescimento. Como foi dito anteriormente, nesta etapa atinge-se a taxa específica de crescimento máxima, que neste caso é de $0,98 \text{ h}^{-1}$ para os resultados obtidos pelo D-Count® e $1,00 \text{ h}^{-1}$ para os resultados obtidos pela contagem padrão em placa (tabela 7). Estes valores foram retirados das equações de reta apresentadas na figura 22, sendo que o declive de cada reta corresponde ao valor de μ (equação 4 – capítulo 1, ponto 3.2). A taxa específica de crescimento depende de vários parâmetro, tais como, a temperatura, pH, disponibilidade de água, níveis de oxigénio, principais tipos de nutrientes, e além disso μ depende do potencial genético da espécie bacteriana e da composição do meio (Lengeler, et al. 1999). Quanto ao valor do tempo de duplicação da população (t_d) (equação 5 – capítulo 1, ponto 3.2) é de aproximadamente 40 minutos (tabela 7) tanto para os resultados obtidos pelo D-Count® como para os resultados obtidos pela contagem padrão em placa, ou seja, após um intervalo de tempo de 40 minutos o número de células duplica.

Tabela 7 - Valores da taxa específica de crescimento e do tempo de duplicação da população

Taxa específica de crescimento (μ)		Tempo de duplicação da população (t_d)	
D-Count®	Contagem padrão em placa	D-Count®	Contagem padrão em placa
$0,98 \text{ h}^{-1}$	$1,00 \text{ h}^{-1}$	$0,70 \text{ h} \cong 42 \text{ min}$	$0,69 \text{ h} \cong 41 \text{ min}$

Como foi dito anteriormente, a duração da fase exponencial depende fundamentalmente da concentração de nutrientes essenciais para o crescimento. Quando um ou mais nutrientes se tornam limitantes e/ou ocorre acumulação de metabolitos inibidores de crescimento, as células torna-se menos capazes de gerar ATP e a taxa de crescimento diminui, ou seja entra-se numa

fase de desaceleração. Isto é possível observar na figura 22, onde o crescimento não é tão acentuado após 24 h e 48 h de incubação. Provavelmente se as amostras fossem analisadas após as 48 h, iria ser atingida a fase estacionária, onde a taxa específica de crescimento seria igual a zero (Assis, 2007; Rodrigues, 2002).

Focando agora no objetivo primordial do trabalho, a relação entre os resultados das contagens microbiológicas obtidas pelo D-Count® e pelo método de referência pode ser observada na figura 23. Considerando os resultados das 20 amostras a equação obtida foi $\text{Log (UFC/mL)} = 0,9588 \times \text{Log (CIB/mL)} - 0,3223$ e o coeficiente de correlação (R^2) estimado entre os diferentes métodos foi de 0,9968. Quando analisado o coeficiente de correlação é possível dizer que existe uma alta associação entre os dois métodos, sendo até quase perfeita devida ao R^2 ser muito próximo de 1. Comparando com dados recolhidos na literatura é possível concluir que este valor encontra-se acima dos valores esperados, uma vez que, estudos realizados em vários países mostraram que os valores de correlação entre o método de referência e a citometria de fluxo variam entre 0,90 e 0,98 (Broutin, 2004; Gunasekera et al., 1999; Holm et al., 2004; CASSOLI et al, 2007; Flinta et al., 2006).

Neste caso a correlação entre os dois métodos foi bastante aceitável, no entanto, torna-se essencial lembrar a importância da utilização de um grande número de amostras neste género de estudos, uma vez que, como foi explicado anteriormente, vários fatores podem interferir nos resultados.

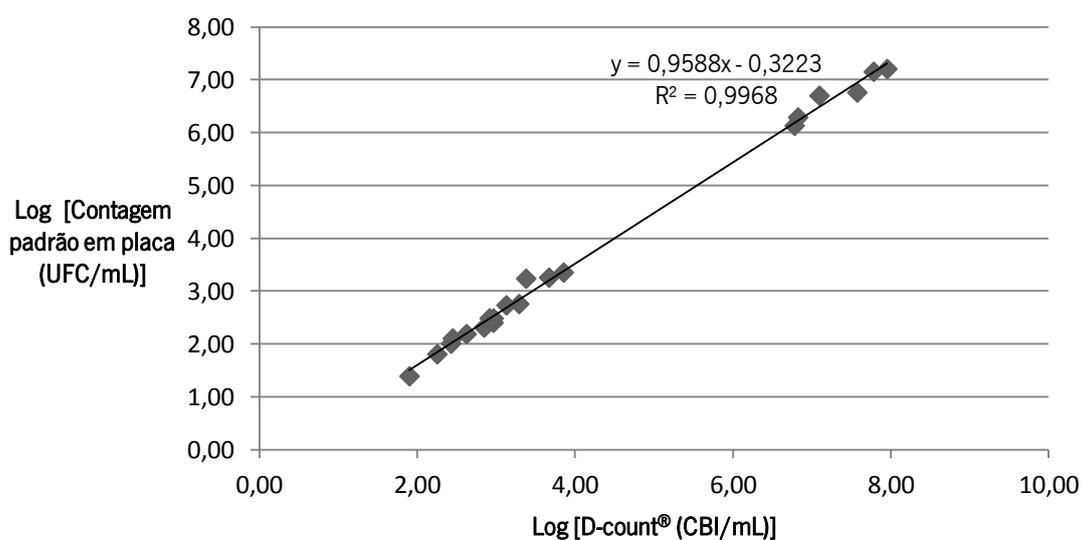


Figura 23 - Correlação entre a contagem microbiana total obtida pela citometria de fluxo e pelo método de contagem padrão em placa

Nas 20 amostras analisadas, as contagens realizadas pelo D-Count® foram superiores às contagens obtidas pelo método de referência. Em média, as contagens pelo D-Count® foram 3,31 vezes maiores do que na contagem padrão em placa.

Esta diferença de valores entre os dois métodos já foi referenciada por outros autores e pode ser explicada por diversos fatores. Como já foi dito anteriormente, a contagem padrão em placa apenas conta colônias e dado que, uma colônia pode ser constituída por apenas uma bactéria ou por um agregado de bactérias, a quantidade total de bactérias presentes no leite pode ser subestimada por este método. Outro aspeto importante é o facto do método de referência ser capaz de enumerar células viáveis mas incapaz de enumerar células viáveis não cultiváveis. Visto que o leite é sujeito a tratamentos térmicos que podem levar a que alguns microrganismos entrem no estado VNC, o método de referência pode ser descrito como insuficiente, uma vez que, estas células em estado VNC apesar de não terem a capacidade de se multiplicarem, podem manter a sua atividade metabólica, permanecendo viáveis, podendo mais tarde vir a crescer no alimento. Por outro lado, o D-Count® fornece os resultados em contagem individual de bactérias, ou seja, os resultados são mais precisos e reais. Além disso, o D-Count® enumera a contagem total, ou seja as bactérias viáveis, incluindo também as bactérias viáveis mas não cultiváveis. Sendo um equipamento totalmente automatizado tem menos influência de erros humanos do que o método de referência. Assim sendo, a contagem microbiana total pelo método de referência é normalmente inferior à contagem realizada por equipamentos de citometria de fluxo.

Em conclusão, é possível afirmar que o D-Count®, na quantificação de *Escherichia coli*, pode ser utilizado como um método alternativo para a contagem padrão em placa, uma vez que, apresenta um coeficiente de correlação alto, indicando assim um alto grau de associação entre os dois métodos.

IV- Conclusões e Perspetivas de Trabalho

Neste capítulo faz-se uma síntese das principais conclusões retiradas na elaboração do trabalho e referem-se algumas ideias/sugestões para um possível trabalho futuro, onde possam ser ultrapassados os obstáculos encontrados na aplicação do D-Count® na quantificação de *Bacillus cereus*,

1. Principais Conclusões

Com o presente trabalho pretendeu-se potenciar a aplicabilidade do equipamento D-Count®, adquirido pela Lactogal para a avaliação da qualidade do leite. O trabalho foi dividido em três partes onde em cada parte foi avaliada uma diferente aplicação para o equipamento: a primeira focou-se na avaliação da aplicação do equipamento D-Count® na avaliação higiénica de superfícies; a segunda centrou-se na aplicação do D-Count® na pesquisa de *Bacillus cereus*; e a terceira na avaliação da aplicação do D-Count® na pesquisa de *Escherichia coli*

Ao longo deste trabalho foi possível responder a todos os objetivos inicialmente traçados e também ultrapassar os problemas que foram surgindo ao longo do estágio.

Os resultados obtidos permitem que sejam retiradas as seguintes conclusões:

- O D-Count® pode ser utilizado como um método alternativo à contagem padrão em placa, para a avaliação higiénica de superfícies, desde que alterado protocolo de análise, uma vez que, o coeficiente de correlação estimado, de 0,92, sugere um alto grau de associação entre os dois métodos.
- A aplicação do D-Count® na quantificação de microrganismos termorresistentes, como o *Bacillus cereus*, não obteve os resultados esperados, para o mesmo protocolo em uso, uma vez que, apesar da alta correlação entre o D-Count® e o método de referência, os valores do D-count® são cerca de 10 vezes mais baixos do que os valores obtidos pela contagem padrão em placa. Assim, é possível concluir que o D-count® não quantifica na totalidade o *Bacillus cereus*.
- O D-count® é incapaz de quantificar o *Bacillus cereus*, no entanto, se o leite estiver contaminado com *Bacillus cereus*, dois dias de incubação, são mais do que suficientes para o crescimento deste microrganismo até valores muito elevados. Este crescimento não é quantificado pelo D-count® mas os resultados obtidos serão positivos (≥ 150 CIB/mL), ou seja, a sua presença é detetada pelo aparelho.

- O equipamento D-Count® pode ser validado na quantificação de *Escherichia coli*, devido à alta correlação ($R^2=0,9968$) entre o método de referência e o equipamento, ou seja, o D-Count® pode ser utilizado como um método alternativo à contagem padrão em placa, com o mesmo protocolo em uso.
- Com a análise da curva de crescimento da *Escherichia coli* é possível concluir que o tempo de incubação, do leite, necessário para a detecção deste microrganismo, pelo D-Count®, deve ser de cerca de 4 h.

2. Perspetivas de Trabalho

Devido a alguns obstáculos encontrados na aplicação do D-Count® na quantificação de *Bacillus cereus*, como trabalho futuro fica a sugestão da realização de uma nova experiência onde o leite poderia ser contaminado com cultura pura de *Bacillus cereus* em vez de amostras pré preparadas, como aconteceu neste trabalho.

Referências Bibliográficas

- Assis, A. (2007). Estudo de *Mycobacterium phlei* (ATCC 11758) como agente agregante para hematita e quartzo. Universidade Federal de Minas Gerais, Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas.
- Baptista, P. (2003). Higienização de equipamentos e instalações na indústria agro-alimentar (1ª ed.). Portugal: Forvisão - consultoria em formação integrada, LDA.
- bioMérieux em <http://www.biomerieux-industry.com/> (acedido em 16 de Setembro de 2014).
- Broutin, P. (2004). Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In J.W. Durr, M.P. Carvalho, & M.V. Santos (Eds.), *O Compromisso da Qualidade do Leite no Brazil* (pp. 317–333). Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo.
- Bylund, G., & Pak, T. (2003). *Dairy processing handbook*. Teknotext AB.
- Campagnaro, B. (2012). Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2r1c sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- CASSOLI, L., FERNANDO MACHADO, P., RODRIGUES, A., & COLDEBELLA, A. (2007). Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 44-48.
- Castro, J. (2007). Azidiol comprimido esterilizado como conservante do leite cru destinado a contagem microbiana por citometria de fluxo. Universidade federal de minas geral, Belo Horizonte.
- Drobniewski, F. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*
- Evangelista, D. (2008). Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos. Escola de Veterinária, Belo Horizonte.
- Fernandes, R. (2009). Liquid Milk Products. In R. Fernandes (Eds.), *Microbiology Handbook - Dairy Products*. (3rd ed.). Royal Society of Chemistry, (pp. 1-15).

- Figueiredo, J., Fernandes, V., Limpo, V., Gonçalves, L., Pedrosa, F., & Diniz, C. (2001). Guia técnico Sectorial - Indústria de Lacticínios. Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Lisboa.
- Finlay, W., Logan, N., & Sutherland, D. (2000). *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. In W. Finlay, N. Logan, & D. Sutherland (Eds.), *Applied Microbiology* (pp. 385–389).
- Flinta, S., Drocourt, J., Walkera, K., Stevenson, B., & Dwyer, M. (2006). A rapid, two-hour method for the enumeration of total viable bacteria in samples from commercial milk powder and whey protein concentrate powder manufacturing plants. *International Dairy Journal*, 16, 379–384.
- Gleeson, D., O'Connell, A., & Jordan, K. (2013). Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 52, 217-227.
- Gunasekera, T., Attfield, P., & Veal, D. (1999). A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1228–1232.
- Harding, F. (1995). Milk Quality. In F. Harding (Eds.), *Hygienic Quality* (pp. 40-59). Anaspen Publication.
- Holm, C., Mathiasen, T., & Jespersen, J. (2004). A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 935-941.
- Jatobá, R. (2009). Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipamento Bactount para monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado. Universidade da Educação e do Desporto, Recife.
- Jepras, R., Carter, J., Pearson, C., Paul, F., & Wilkinson, M. (1995). Development of a Robust Flow Cytometric Assay for Determining Numbers of Viable Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, 61, 2696-2701.
- Lehtolainen, T. (2004). *Escherichia coli* mastitis - Bacterial factors and host response. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Finland.

- Lengeler, J. W., Drews, G., & Schelegel, H. G. (1999). *Biology of the Prokaryotes*. (1st ed.) New York: Blackwell Science.
- Lin, S. (1997). Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. The Faculty of Graduate Studies of The University of Guelph, Canada.
- Maieski, L. (2011). Os principais microrganismos patogênicos que afetam a qualidade do leite. Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto Alegre.
- Medical em <http://www.news-medical.net/health/Flow-Cytometry-Whatis-Flow-Cytometry.aspx>. (acedido em 16 de Setembro de 2014).
- Montanhini, M., & Pintob, J. (2012). Ocorrência de *Bacillus cereus* em Leite Comercializado nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 14, 155-158.
- Neto, A. (2009). Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipamento batcount para monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado. Ministério da Educação e do Desporto Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Neves, R. (2008). Influência do grupo de microrganismos - mesófilos, psicrófilos - na linearização dos resultados do equipamento Bactoscan FC. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Goiânia.
- Niamsiri, N. (2009). Dairy Products. In M. Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology*. Applied Microbiology (pp. 34-45). Elsevier Inc.
- Oliveira, C. (2012). Programa de pós-graduação em medicina veterinária área de concentração em higiene veterinária e processamento tecnológico de produtos de origem animal. Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- Oliver, J. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43, 93-100.
- Tetra Pak em <http://www.tetrapak.com/packages> (acedido em 15 de Agosto de 2014).
- Pales, A., & Santos, K. (2005). A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, 1, 162-173.

- Ponciano, R. (2010). Avaliação da Qualidade Higiênica da Produção de Leite de pequenos Ruminantes e de Queijo Fresco da Região Rabaçal. Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterenária , Lisboa.
- Rezende-Lago, N., Rossi Jr., O., Vidal-Martins, A., & Amaral, L. (2007). Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP , Jaboticabal.
- Ribas, L. (2008). Higienização de instalações e equipamentos em indústria de laticínios. Universidade de Viana do Castelo, Curitiba PR.
- Rodrigues, A. (2002). Desenvolvimento de um Método Voltamétrico para a Avaliação do Crescimento Microbiano. Universidade do Minho, Braga.
- Silva, G., Silva, M., & Ferreira, M. (2012). Produção Alimentícia - Processamento do leite. UFRPE/CODAI: E-Tec.
- Silva, T., Reis, A., Hewitt, C., & Roseiro, J. (2004). Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. Boletim de Biotecnologia , 77, 32-40.
- Life Technologies em <https://www.lifetechnologies.com/pt/en/home/support/tutorials.html> (acedido em 16 de Setembro de 2014).
- Tortora, J., Funkel, R., & Case, L. (2012). Microbiologia (10ª ed.). ARTMED.
- Watanuki, M. (2008). Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura. Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004. Jornal Oficial da União Europeia N.º L 139/1 de 30.4.2004

