

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**Sobrevivência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*  
Enteritidis Durante o Armazenamento de Hambúrguer de Frango  
Congelado**

Dissertação de Mestrado

Letícia Sopeña Casarin

Porto Alegre  
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**Sobrevivência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*  
Enteritidis Durante o Armazenamento de Hambúrguer de Frango  
Congelado**

Letícia Sopeña Casarin  
Química de Alimentos (UFPEL)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em Microbiologia de  
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março de 2005

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, professor Adriano Brandelli, pela confiança, paciência, orientação, ensinamentos e, principalmente pelo exemplo de profissionalismo.

Ao professor Eduardo Tondo, pela confiança, amizade, por toda a orientação neste trabalho e, principalmente pelo incentivo e exemplo de dedicação e determinação.

Ao Núcleo de Assistência Estatística/UFRGS, pela ajuda na análise estatística.

Aos professores, funcionários e alunos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ UFRGS, pelo ótimo ambiente de trabalho. Em especial ao funcionário Jorge pela grande ajuda na limpeza e organização do material

Ao professor Jeverson Frazon, pela utilização de equipamentos em seu laboratório.

Ao Bacana e a Aline pelo auxílio que tornaram possível a realização dos experimentos de extração e análise de ácidos graxos.

À bolsista Manuela Klein, que tanto me ajudou na realização desta pesquisa e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, pela convivência e amizade. Em especial a Mercedes e a Kátia por todo auxílio durante a realização do trabalho.

Aos colegas de mestrado pela convivência e troca de experiências. Especialmente a Fernanda Arboite e a Michele Hoeltz, pela a amizade e companheirismo, que tornam o dia a dia mais agradável.

Aos amigos de longe que tanto me incentivaram, por estarem sempre lá, apesar da distância e da minha ausência. E aos amigos de perto que conquistei neste período, pelo carinho e companheirismo que tornaram tudo mais fácil.

Aos meus familiares, por contribuírem, cada um a sua maneira para manter a minha estabilidade emocional. Especialmente a minha vó, que mesmo de longe e muitas vezes em silêncio, tanto me incentivou.

Aos queridos Bento, Zaida e Giuliana, pelo carinho, amizade, incentivo e por cuidarem de mim como filha e irmã.

As minhas irmãs Fabiana e Renata, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, Renato e Marília que foram os meus grandes mestres ao me ensinar os caminhos da persistência, humildade e do estudo, por todo o amor, compreensão, paciência e apoio, mesmo à distância.

Ao Fabrício, meu amor, por ser o meu maior incentivador, por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, por estar sempre ao meu lado, até mesmo nas jornadas de trabalho em fins de semana e feriados, mas principalmente por estar presente com o seu amor, nos bons e maus momentos.

# **Sobrevivência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis Durante o Armazenamento de Hambúrguer de Frango Congelado**

Autor: Letícia Sopeña Casarin  
Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

## **RESUMO**

Com o objetivo de avaliar a sobrevivência ao congelamento de microrganismos potencialmente patogênicos, hambúrgueres de frango foram contaminados com *Escherichia coli* (EHC), *Staphylococcus aureus* (SAFH) e *Salmonella* Enteritidis (SE86) e armazenados a -18°C. Os mesmos microrganismos e ainda *E. coli* ATCC 25972, *S. aureus* ATCC 25923, and *S. Enteritidis* ATCC 13076 também foram inoculados em água peptonada 0,1% e congelados a -18°C, a fim de avaliar um possível efeito protetor dos componentes do hambúrguer sobre os microrganismos. A quantificação dos microrganismos foi realizada nos intervalos de 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de congelamento. Com o propósito de estudar as alterações nos ácidos graxos das células microbianas expostas ao congelamento, foram extraídos os ácidos graxos de cada bactéria, congelada e não congelada, e estes foram analisados por cromatografia gasosa. Os resultados demonstraram que, de modo geral, houve uma redução média de menos de 1 unidade logarítmica ( $\log_{10}$ ) no número de células artificialmente inoculadas em hambúrgueres de frango. As reduções obtidas para cada microrganismo em água peptonada 0,1% foram significativamente ( $P < 0,05$ ) maiores do que as reduções observadas em hambúrguer de frango, sugerindo a existência de um efeito crioprotetor dos componentes do hambúrguer. Em todos os experimentos, as reduções mais expressivas foram observadas nas primeiras semanas de congelamento. Ocorreram alterações expressivas na composição de ácidos graxos de *S. aureus* (SAFH) e *S. aureus* ATCC 25923, o que pode indicar que estes microrganismos alteraram a composição dos seus ácidos graxos como resposta ao estresse causado pelo congelamento.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (75 p.) Março de 2005.

# **Survival of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis During Storage in Frozen Chicken Hamburger<sup>1</sup>**

Author: Leticia Sopeña Casarin  
Adivisor: Dr. Adriano Brandelli  
Co-advisor: Dr. Eduardo César Tondo

## **ABSTRACT**

With the purpose to evaluate the survival of pathogens to the freezing storage, chicken hamburgers were contaminated with *Escherichia coli* (EHC), *Staphylococcus aureus* (SAFH), and *Salmonella* Enteritidis (SE86), and stored at -18°C. The same microorganisms and *E. coli* ATCC 25972, *S. aureus* ATCC 25923, and *S. Enteritidis* ATCC 13076 were also stored at the same temperature in frozen 0.1% peptone water to evaluate a possible protective effect of hamburger compounds in bacterial cells. The quantification of the microorganisms was carried out in the intervals of 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 and 28 days of storage. With the purpose of studying the alterations in the fat acids of bacterial cells due to frozen storage, fat acids of each bacterium were extracted and analyzed by gas chromatography. The results demonstrated that, overall, there was a mean reduction of less than 1 logarithmic unit ( $\log_{10}$ ) in the number of cells artificially inoculated in chicken hamburgers. The reductions obtained for each microorganism in 0.1% peptone water were significantly ( $P < 0,05$ ) larger than the reductions observed in chicken hamburger, suggesting the existence of an cryoprotective effect due to the hamburger compounds. In all experiments, most expressive reductions were observed in the first weeks of storage. Expressive alterations in the fat acids composition of *S. aureus* (SAFH) and *S. aureus* ATCC 25923 were observed, and these could be interpreted as a response to the freezing stress.

<sup>1</sup> Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology - Food Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (75 p.). March, 2005.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	3
2.1 Objetivo Geral .....	3
2.2 Objetivos Específicos .....	3
3. Revisão Bibliográfica .....	4
3.1 Produtos de Carne de Frango .....	4
3.2 Hambúrguer de Frango .....	5
3.3 Contaminação Microbiológica em Hambúrguer .....	7
3.4 Toxinfecções Alimentares Envolvendo Hambúrguer .....	8
3.4.1 Toxinfecções Causadas por <i>Escherichia coli</i> .....	8
3.4.2 Toxinfecções Causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
3.4.3 Toxinfecções Causadas por <i>Salmonella</i> spp. ....	11
3.5 Congelamento de Alimentos .....	12
3.5.1 Congelamento de Alimentos e microrganismos .....	13
3.5.1.1 Efeitos do Congelamento Sobre os Microrganismos .....	15
3.5.1.2 Fatores que Afetam o Comportamento dos Microrganismos Durante o Congelamento .....	16
3.5.1.3 Mecanismos de Resistência dos Microrganismos ao Congelamento ....	19
4. Materiais e Métodos .....	21
4.1 Instalações .....	21
4.2 Meios de Cultura, Diluentes e Reagentes .....	21
4.3 Seleção e Armazenamento dos Hambúrgueres de Frango .....	22
4.4 Avaliação da Qualidade Microbiológica dos Hambúrgueres de Frango .....	22
4.5 Linhagens Bacterianas .....	23
4.6 Preparo dos Inóculos .....	23

4.7 Contaminação dos Hambúrgueres de Frango .....	25
4.8 Avaliação da Sobrevivência em Hambúrguer de Frango Durante o Armazenamento a -18°C.....	26
4.8.1 Contagem de <i>Escherichia coli</i> .....	27
4.8.2 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
4.8.3 Contagem <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	28
4.9 Avaliação da Influência do Descongelamento do Hambúrguer de Frango na Sobrevivência dos Microrganismos.....	29
4.10 Avaliação da Sobrevivência em Água Peptonada 0,1% Durante o Armazenamento a -18°C.....	29
4.10.1 Contagem de <i>Escherichia coli</i> .....	31
4.10.2 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
4.10.3 Contagem <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	31
4.11 Análise da Composição de Ácidos Graxos .....	32
4.11.1 Preparo das Culturas para Extração dos Ácidos Graxos .....	32
4.11.2 Extração de Ácidos Graxos.....	32
4.11.3 Cromatografia Gasosa .....	33
4. 12 Análise Esttística.....	34
5. Resultados e Discussão.....	36
5.1 Qualidade Microbiológica dos Hambúrgueres de Frango .....	36
5.2 Influência do Descongelamento do Hambúrguer de Frango na Sobrevivência dos Microrganismos.....	37
5.3 Sobrevivência dos Microrganismos em Hambúrguer de Frango Durante o Armazenamento a -18°C.....	39
5.4 Sobrevivência dos Microrganismos em Água Peptonada 0,1% Durante o Armazenamento a -18°C.....	43
5.5 Comparação da Sobrevivência dos Microrganismos em Água Peptonada com a Sobrevivência em Hambúrguer de Frango.....	46
5.6 Composição de Ácidos Graxos .....	49
6. Conclusões .....	54
7. Perspectivas.....	56
8. Referências Bibliográficas.....	57
9. Apêndices .....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Linhagens bacterianas utilizadas e suas fontes.....	23
TABELA 2: Provas bioquímicas utilizadas para avaliar a pureza das culturas bacterianas.....	24
TABELA 3: Qualidade microbiológica dos hambúrgueres de frango.....	37
TABELA 4: Contagens de <i>S. aureus</i> (SAFH), <i>E. coli</i> (ECHC) e <i>S. Enteritidis</i> (SE86) durante o descongelamento de hambúrguer de frango em temperatura ambiente.....	38
TABELA 5: Reduções no número de células de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. Enteritidis</i> em hambúrguer de frango armazenado a -18° C, por 28 dias.....	40
TABELA 6: Reduções no número de células de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. Enteritidis</i> em água peptonada 0,1% armazenada a -18° C por 28 dias.....	44
Tabela 7: Composição de ácidos graxos de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Enteritidis</i> submetidas ou não ao armazenamento a -18°C.....	50



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fluxograma de produção de hambúrguer .....	06
FIGURA 2: Hambúrguer de frango contaminado com <i>S. Enteritidis</i> .....	25
FIGURA 3: Sobrevivência de <i>E. coli</i> ECHC (◆), <i>S. Enteritidis</i> SE86 (●) e <i>S. aureus</i> SAFH (∇) em hambúrguer de frango armazenado a -18°C por 28 dias. .....	39
FIGURA 4: Sobrevivência de <i>E. coli</i> ECHC (∇) e <i>E. coli</i> ATCC 25972 (●), em água peptonada 0,1%, durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.....	45
FIGURA 5: Sobrevivência de <i>S. aureus</i> SAFH (∇) e <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (●) em água peptonada 0,1%, durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.....	45
FIGURA 6: Sobrevivência de <i>S. Enteritidis</i> SE86 (∇) e <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 (●) em água peptonada 0,1% durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.....	46
FIGURA 7: Sobrevivência de <i>E. coli</i> ECHC em hambúrguer de frango (○) e em água peptonada 0,1% (■), durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.....	47
FIGURA 8: Sobrevivência de <i>S. aureus</i> SAFH em hambúrguer de frango (○) e em água peptonada 0,1% (■), durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.....	47
FIGURA 9: Sobrevivência de <i>S. Enteritidis</i> SE86 em hambúrguer de frango (○) e em água peptonada 0,1% (■), durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ECHC .....	<i>Escherichia coli</i> human cystitis
SAFH .....	<i>Staphylococcus aureus</i> foodhandlers
SE86 .....	<i>Salmonella</i> Enteritidis número 86
ATCC .....	American Type Culture Collection
R. S. ....	Rio Grande do Sul
p. ....	Página
SEBRAE ...	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SENAI .....	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
CDC .....	Center for Disease Control and Prevention
EUA .....	Estados Unidos da América
IFST .....	International of Food Safety
UFC .....	Unidade Formadora de Colônias
NMP .....	Número mais Provável
$a_w$ .....	Atividade de água
PH .....	Potencial hidrogeniônico
CSP .....	<i>Cold shock proteins</i>
ICTA .....	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
UFRGS .....	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
FDA .....	Food and Drug Administration
BHI .....	Brain Heart Infusion (infusão de cérebro e coração)
VM .....	Vermelho de metila
VP .....	Voges Proskauer
TSI .....	Triple Sugar Iron (três açúcares e ferro)
LIA .....	Lysine Iron Ágar (ágar lisina e ferro)
PCA .....	Plate Count Agar (ágar padrão para contagem)
VRBA .....	Violet Red Bile Agar (ágar cristal violeta vermelho neutro bile)
rpm .....	Rotações por minutos
min. ....	Minutos
BAME .....	Bacterial Acyl Metil Esters
SPSS .....	Statistical Package for the Social Sciences
ANOVA ....	Analysis of Variance
N. D. ....	Não detectado
VNC .....	Viável mas não cultivável

## 1. INTRODUÇÃO

As carnes e os produtos cárneos estão frequentemente associados com doenças veiculadas por alimentos. Dentre os produtos cárneos, os hambúrgueres são considerados alimentos que requerem atenção, pois seu consumo tem aumentado expressivamente, são fabricados com matéria-prima que pode apresentar contaminação microbiana e seu processo produtivo pode propiciar contaminação patogênica devido a falhas nas práticas de higiene.

Nos últimos anos, diversos surtos de toxinfecções alimentares ocorreram devido ao consumo de hambúrgueres inadequadamente processados, os quais estavam contaminados com microrganismos patogênicos.

Atualmente, o Brasil é um dos mais importantes produtores de carne de frango no mundo e a produção de produtos de frango, como os hambúrgueres, tem aumentado significativamente. Diversos fatores têm contribuído para tornar este produto largamente consumido, como o baixo custo, o menor conteúdo de gordura se comparado com as outras carnes e ainda o curto período de tempo necessário para o seu preparo.

Apesar das severas medidas de controle de qualidade implantadas nas indústrias de produtos avícolas, a presença de bactérias patogênicas em

hambúrgueres de frango pode ocorrer e, por isso, este alimento representa uma significativa preocupação para fornecedores, consumidores e órgãos oficiais de saúde pública.

Uma vez que o processamento térmico inadequado tem sido apontado como a principal causa dos diversos surtos alimentares envolvendo hambúrgueres e que esse processamento pode ser considerado uma das principais barreiras no controle de toxinfecções, as demais etapas do processamento de hambúrgueres devem ser avaliadas quanto a capacidade de diminuir o número de microrganismos patogênicos. Dentre esses processamentos, pode-se citar o congelamento, uma vez que os hambúrgueres são geralmente comercializados em temperaturas de aproximadamente  $-18^{\circ}\text{C}$ . Alguns estudos têm demonstrado que o congelamento de produtos cárneos pode fornecer uma margem de segurança adicional aos alimentos, porque pode causar a morte ou danificar significativamente boa parte das células de uma população microbiana.

No entanto por outro lado, diversos pesquisadores observaram que um grande número de microrganismos pode permanecer viável em alimentos, mesmo depois de um longo período de congelamento. Portanto, torna-se necessária a realização de estudos que investiguem o comportamento de microrganismos patogênicos específicos, em alimentos nos quais estes microrganismos são mais incidentes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  na sobrevivência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis em hambúrguer de frango.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do tempo de armazenamento congelado na sobrevivência destes microrganismos;
- Verificar se os constituintes do hambúrguer de frango conferem proteção às células bacterianas durante o armazenamento congelado;
- Estudar se há diferença entre as taxas de sobrevivência de microrganismos relacionados a surtos ou isolados de humanos e microrganismos ATCC (American Type Culture Collection);
- Verificar se o armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  modifica a composição de ácidos graxos dos microrganismos estudados.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Produtos de carne de frango**

Nos últimos 20 anos, a produção mundial de carnes dobrou de 100 milhões de toneladas para 200 milhões e o frango foi o maior responsável por este aumento (Schorr, 1999).

O mercado internacional de carnes vem passando por importantes transformações, as quais vem alterando, tanto os níveis de consumo das diferentes proteínas de origem animal como a comercialização nas principais cadeias agroindustriais do setor. O consumo per capita mundial de carnes vermelhas permaneceu praticamente inalterado, ao redor de 24-26kg/ano, enquanto que o consumo de carne de frango dobrou, passando de 4,5 para 9,0kg/habitante/ano (Bliska, 1997).

Estimativas demonstram que o consumo global de carne de frango será de 80 milhões de toneladas em 2005 e 100 milhões de toneladas em 2015, crescimento este muito expressivo, se comparado com os 53 milhões de toneladas consumidas em 1997 (Schorr, 1999).

No Brasil a situação é muito semelhante, o consumo per capita de frango aumentou de 2,3kg/ habitante/ano, em 1970, para 23,8kg, em 1997, um

crescimento de 943%. O consumo das outras carnes evoluiu muito mais lentamente; o de carne bovina cresceu 144% e o de carne suína aumentou somente 12%, nos últimos 27 anos (Schorr, 1999).

Além do aumento no consumo de carne de aves, a forma de comercialização desta carne também tem sofrido muitas modificações, nos últimos anos (Bliska, 1997). Nos EUA, o consumo de frango inteiro e de cortes caiu de 74% para 54% e o de carne de frango processada aumentou de 26% para 46% de todo o frango produzido no país (Schorr, 1999).

Seguindo a tendência mundial, muitos consumidores brasileiros têm preferido adquirir alimentos congelados ou semi-prontos. Por esse motivo, a agroindústria brasileira vem inovando, passando a explorar esse nicho de consumidores que desejam uma alimentação mais prática (Bliska, 1997).

O baixo custo e o menor conteúdo de gordura, juntamente com o curto período de tempo necessário para o preparo dos produtos industrializados de frango, como o hambúrguer, são os principais fatores que têm contribuído para o aumento do consumo destes produtos (Astorga et al., 2002).

### **3.2 Hambúrguer de frango**

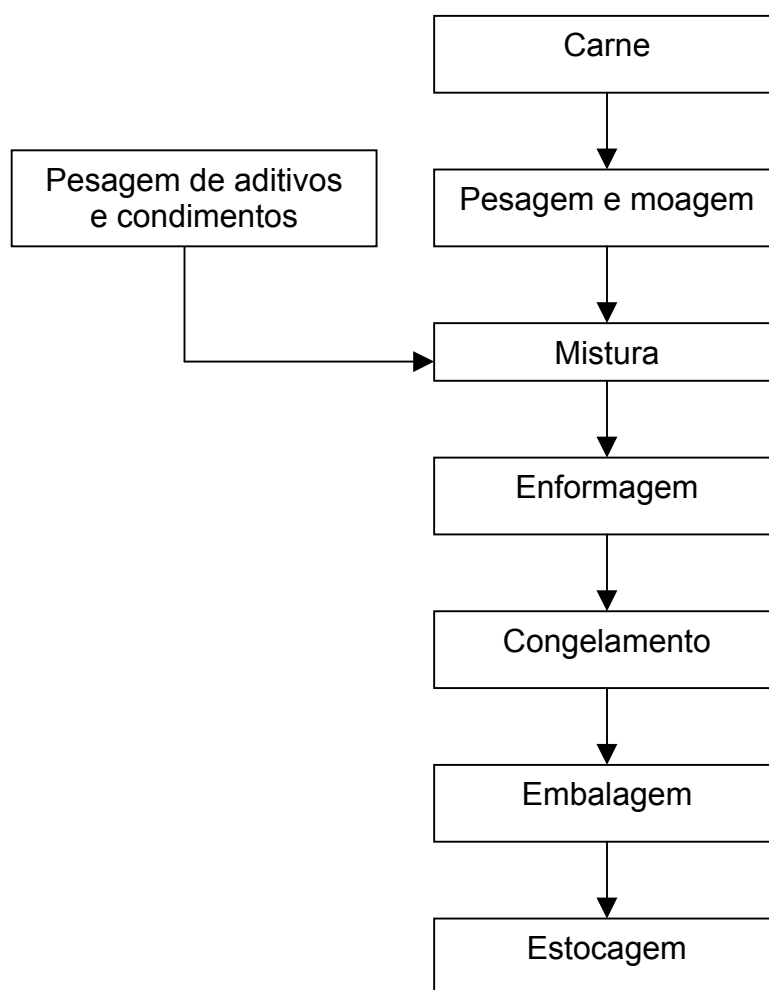
Hambúrguer é o produto cárneo industrializado obtido da carne moída inspecionada, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado (Brasil, 2000).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer (Brasil, 2000), os hambúrgueres podem ser fabricados com carne

moída de bovino, de frango, de suíno ou de peru e podem ser classificados como produtos crus, semi-fritos, cozidos, fritos, congelados ou resfriados. Estes devem conter um teor máximo de gordura de 23%, um mínimo de 15% de proteína e 3% de carboidratos totais.

O mesmo regulamento permite a adição de até 30% de carne mecanicamente separada, mas somente em hambúrguer que será cozido antes da comercialização (Brasil, 2000).

Um esquema simplificado de produção de hambúrguer está apresentado na Figura 1.



**FIGURA 1:** Fluxograma de produção de hambúrguer (SEBRAE/SENAI, 2000).



### 3.3 Contaminação microbiológica em hambúrguer

Devido ao aumento do consumo e às suas características intrínsecas, os produtos de frango são considerados alimentos que requerem atenção. A contaminação bacteriana destes alimentos, apesar de ser indesejável, muitas vezes, é inevitável e depende do nível de contaminação da carcaça de frango utilizada como matéria-prima, das práticas de higiene utilizadas durante a manipulação e do tempo e temperatura de armazenamento (Astorga et al., 2002).

De modo geral, os produtos cárneos estão expostos à contaminação microbiana devido às etapas envolvidas no seu processamento, sua composição química, rica em proteínas, lipídios e sais minerais, elevado teor de umidade e pH apropriado (Ranucci et al., 2004).

Durante o processamento tecnológico de elaboração de hambúrgueres, etapas como a pesagem, moagem, mistura, congelamento e embalagem envolvem operações de risco no que diz respeito aos perigos microbiológicos, tais como, contaminação, multiplicação e resistência microbiana (Oliveira et al., 1999).

Além disso, os hambúrgueres são elaborados com carne moída, que é um produto perecível, no qual pode ocorrer o desenvolvimento de um número inaceitável de microrganismos em um curto período de tempo (Tamminga et al., 1982).

Bactérias patogênicas como *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp., são freqüentemente encontrados nestes produtos. (Duitschaeffer et al., 1977;

Foster et al., 1977; Pezzotti et al., 2001) e dependendo da linhagem, podem provocar surtos de toxinfecções alimentares.

### **3.4 Toxinfecções alimentares envolvendo hambúrguer**

Durante o período de 1980 a 2000 no estado do Rio Grande do Sul, foram registrados pela Secretaria de Saúde e Meio Ambiente, 1918 surtos de toxinfecções alimentares, envolvendo mais de 142.000 pessoas. Nesse mesmo período, o *Staphylococcus aureus*, a *Salmonella* spp. e os coliformes fecais foram os principais agentes etiológicos dos surtos investigados, sendo as carnes e produtos cárneos envolvidos em boa parte desses surtos (Rio Grande do Sul, 2001).

Diversos surtos de toxinfecções alimentares já foram associados ao consumo de hambúrgueres. Nestes casos foi verificado que o alimento envolvido havia sido preparado com carne contaminada com microrganismos patogênicos e foi submetido a um tratamento térmico inadequado. Vários outros autores têm relatado a ocorrência de surtos devido ao consumo de hambúrguer mal cozido (Marriot et al., 1980; Belongia et al., 1991; Doyle, 1991; CDC, 1994; CDC, 1995; Sage & Ingham, 1998). Alguns exemplos são descritos a seguir.

#### **3.4.1 Toxinfecções causadas por *Escherichia coli***

Nos últimos 20 anos, *E. coli* tem sido envolvida em muitos surtos de toxinfecções alimentares em todo o mundo. Embora muitos alimentos tenham sido associados aos casos, os hambúrgueres têm sido os alimentos mais

envolvidos (Willshaw et al., 1994; CDC, 1997; Bell & Kyriakides, 1998; Meng & Doyle, 1998). Esse microrganismo, principalmente o sorovar *E. coli* O157:H7, têm sido o responsável pela grande maioria dos surtos em muitos países como EUA, Canadá, Reino Unido e Japão (Tamplin, 2002).

A *E. coli* O157:H7 começou a ser mais amplamente estudada a partir de dois surtos de colite hemorrágica, ocorridos em Oregon e Michigan, nos EUA, devido ao consumo de sanduíches com carne moída mal cozida. Dentre os 43 pacientes, todos apresentaram diarreia sanguinolenta e severas dores abdominais, sendo que 63% tiveram náuseas e 49% vômitos. Somente 7% das vítimas apresentaram febre. Acredita-se que a dose infectiva neste caso, foi menor que 10 UFC (Jay, 2000).

No período de 1982 a 1995, os hambúrgueres responsáveis por 50% dos surtos causados por *E. coli* O157:H7 ocorridos nos EUA (Wachsmuth et al., 1997). Nesse mesmo país, em 1993, ocorreram dois grandes surtos envolvendo 732 e 782 pessoas, respectivamente, devido ao consumo de hambúrgueres mal cozidos (IFST, 1996). Em um deles, o qual ocorreu nos estados da Califórnia, Nevada, Washington e Idaho, houve 3 mortes. Outros dois surtos foram descritos nos estados de New Jersey e na Virginia, EUA, em 1994. Tais surtos foram rastreados até o consumo de hambúrgueres e causaram 46 e 20 vítimas não fatais, respectivamente (Jay, 2000). Em 1996, um surto ocorrido na Escócia, devido ao consumo de hambúrguer contaminado com *E. coli* O157:H7, envolveu 496 pessoas e foi responsável por 20 mortes (Pennington, 1998).

### 3.4.2 Toxinfecções causadas por *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes responsáveis por surtos de toxinfecções no mundo (Zhang et al., 1998). Há algumas décadas, *S. aureus* tem sido responsável por 25% de todos os surtos ocorridos nos EUA. No mesmo país, de 1988 a 1992, ele foi responsável por 1,8%, 2,8%, 2,4%, 1,7% e 1,5% das toxinfecções, respectivamente (Bean et al., 1997). Durante o mesmo período de 5 anos, *S. aureus* causou 5,1% dos surtos registrados na Europa (Tirado & Schimdt, 2001). No Rio Grande do Sul, durante o ano de 2000, este agente foi responsável por 5,1% dos casos de toxinfecções notificados pela Secretaria da Saúde e Meio Ambiente, sendo o segundo agente etiológico dos surtos ocorridos neste período (Rio Grande do Sul, 2001).

No ano de 2002, foram registrados pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA, dois surtos em estados diferentes dos EUA, envolvendo um total de 59 pessoas, devido ao consumo de hambúrguer contaminado com *S. aureus* (CDC, 2002).

Muitas estirpes de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas, e estas toxinas termoestáveis é que são as responsáveis pelos sintomas da intoxicação (Balaban & Rasooly, 2001; Tamarapu et al., 2001). A dose de enterotoxina necessária para produzir os sintomas é menor que 1,0 µg/kg (300 a 500 ng). Esta quantidade de toxina é produzida por 10<sup>5</sup> microrganismos por grama, porém a toxina será produzida apenas em temperaturas de 10 a 48°C, em pH de 4,5 a 9,6 e em alimentos com a<sub>w</sub> entre 0,87 e 0,99 (Forsythe, 2002).

### 3.4.3 Toxinfecções causadas por *Salmonella spp.*

Anualmente, aproximadamente 40.000 casos de salmonelose são notificados pelo Center for Disease Control and Prevention nos EUA, porém, acredita-se que o número de casos que ocorrem realmente seja de 1,4 milhões, devido a sub-notificação (Mead et al., 1999).

Em 2002, um surto de salmonelose, envolvendo 26 presos de uma penitenciária dos EUA, foi associado ao consumo de hambúrguer bovino contaminado com *S. Heidelberg* (CDC, 2002). No mesmo ano, também nos EUA, 47 pessoas foram envolvidas em um surto devido ao consumo de hambúrguer contaminado com *S. Newport* (CDC, 2002).

Nas últimas décadas, o sorovar predominante apontado como causador de infecções alimentares mudou de *S. agona*, *S. Hadar* e *S. Typhimurium* para *S. Enteritidis*, em muitos países (D'Aoust, 1994). *S. Enteritidis* é atualmente o agente etiológico de salmoneloses predominante nos EUA (Lin et al., 1996), País de Gales (Liebana et al., 2002), França (Bouvet et al., 2002), Itália (Muresu, et al., 2001), Polônia (Glósnicka & Kunikowska, 1994), entre outros (CDC, 1995, Rabscha et al., 2001).

No estado do Rio Grande do Sul a *S. Enteritidis* tem sido apontada como o principal agente etiológico isolado de alimentos envolvidos em surtos alimentares nos últimos anos (Geimba et al., 2004). Nestes surtos, os principais alimentos envolvidos foram os produtos de origem animal, principalmente aqueles oriundos de frangos (Rio Grande do Sul, 2001, Costalunga & Tondo, 2002), evidenciando a necessidade de controle de produtos como os hambúrgueres de frango.

### 3.5. Congelamento de alimentos

O congelamento é importante no processamento de alimentos tanto no aspecto econômico, por minimizar a deterioração dos alimentos, quanto ao que diz respeito à saúde pública, pois contribui para o controle de toxinfecções alimentares (El-Kest & Marth, 1992).

Historicamente, o congelamento de alimentos teve origem na China, onde barris de gelo eram usados para preservar os alimentos por volta do ano 1000 A.C. Os gregos e os Romanos também armazenavam alimentos em barris com neve (Archer, 2004). Existem relatos do consumo de alimentos congelados, tais como gelo com aromatizantes (picolé) e sorvetes já na Idade Média (Lund, 2000).

Na metade do século IXX, nos EUA se utilizava sal e gelo para reduzir a temperatura com o propósito de congelar peixe. Neste mesmo período, carnes e aves congeladas, assim como peixes e ovos, eram transportados em navios, por longas distâncias (Lund, 2000).

Alimentos congelados começaram a ser comercializados em 1929 (Person & Londahl, 1993). Logo em seguida, nos anos 1930, iniciava-se a revolução dos alimentos congelados com o crescimento do número e variedade destes alimentos, os quais passaram a fazer parte do estilo de vida das famílias (Lund, 2000).

Outro fato marcante na história dos alimentos congelados foi o início da comercialização de refrigeradores e *freezers* domésticos, nas décadas de

50 e 60. Neste mesmo período, começam a aparecer as publicações sobre a conservação dos alimentos pelo frio (Geiges, 1996).

Nas décadas de 80 e 90, o aumento do número de famílias com *freezer* doméstico e o início da utilização do forno de microondas, somados à busca crescente por maior praticidade, impulsionaram ainda mais o consumo destes alimentos. Somente no ano de 1994 o segmento de alimentos congelados cresceu 68,9% (Bliska, 1997). Neste mesmo período a mudança no comportamento da população, que passou a consumir alimentos fora das residências fez crescer o número de redes de “fast food” e restaurantes, que tornaram-se os principais consumidores dos produtos congelados.

### **3.5.1 Congelamento de alimentos e microrganismos**

A utilização de baixas temperaturas para conservar alimentos, baseia-se no fato de que o crescimento microbiano pode ser retardado em temperaturas acima da temperatura de 0°C e normalmente é inibido por temperaturas abaixo deste valor. Isto ocorre porque as reações metabólicas dos microrganismos são catalisadas por enzimas e a taxa de reação, a qual é catalisada enzimaticamente, é dependente da temperatura. A diminuição da temperatura, provoca uma redução na taxa de reação (Jay, 2000).

As temperaturas de armazenamento de alimentos congelados são aquelas iguais ou abaixo de -18°C. Nessa temperatura, sob condições normais, o crescimento dos microrganismos é inibido, mas alguns microrganismos podem crescer nas temperaturas de congelamento, porém com uma velocidade extremamente lenta (Jay, 2000).

Existem muitas espécies bacterianas que podem crescer em temperaturas abaixo de 7°C, principalmente entre os gêneros de bactérias Gram negativas. Os microrganismos que crescem em temperaturas abaixo de 20°C, são chamados de psicrófilos (Morita, 1975). No entanto, os microrganismos que são capazes de crescer em temperaturas entre 0°C e 7°C, e têm suas temperaturas ótimas de crescimento próximas a 30°C, são classificados como psicrotróficos (Jay, 2000).

O crescimento de microrganismos a 0°C ou menos, tem sido demonstrado por diversos pesquisadores, e a temperatura de crescimento mais baixa observada em microrganismos de interesse em alimentos foi de -34,4°C, para uma levedura rosa em caldo Sabouraud (McCormack, 1950). Weinzirl & Gerdeman (1929) observaram o crescimento de bactérias abaixo de -20°C. O crescimento de bolores e leveduras em temperaturas abaixo de 0°C é mais provável que o crescimento de bactérias, uma vez que os fungos podem crescer em condições de baixa atividade de água.

Isto pode ser explicado porque, além das características de cada microrganismo, o crescimento em temperaturas abaixo de 0°C, depende do conteúdo de nutrientes, do pH e da quantidade de água livre ( $a_w$ ) (Jay, 2000).

A  $a_w$  dos alimentos tende a diminuir a medida que a temperatura cai abaixo do ponto de congelamento. E é a partir desta redução na  $a_w$  que inicia-se a série de efeitos causados nos microrganismos quando estes são congelados, que são descritos a seguir.



### 3.5.1.1 Efeitos do congelamento sobre os microrganismos

Muitas teorias sobre o que ocorre com os microrganismos durante o processo de congelamento têm sido propostas, sendo que as mais freqüentemente abordadas são:

- a) desidratação da célula, devido ao fato de que a água livre congela, formando cristais de gelo;
- b) danos mecânicos na parede celular e na membrana, causados pela formação de cristais de gelo extra e intracelulares;
- c) aumento da viscosidade do material celular, como consequência direta da concentração da água na forma de cristais de gelo;
- d) perda de gases citoplasmáticos, como oxigênio e gás carbônico. Esta perda de oxigênio suprime a respiração em células aeróbias;
- e) mudanças no pH da matéria celular de 0,3 a 2,0 unidades para mais ou para menos;
- f) mudanças na concentração de eletrólitos celulares, como consequência da concentração da água na forma de cristais de gelo;
- g) alteração no estado coloidal do protoplasma celular, devido ao desbalanço eletrolítico causado pela desidratação;
- h) desnaturação das proteínas celulares, como consequência da diminuição do conteúdo de água e da concentração de eletrólitos (Baust, 1963; El-Kest & Marth, 1992; Jay, 2000).

Algumas destas hipóteses não foram completamente investigadas até o momento, mas sabe-se que a ocorrência destes efeitos é influenciada por vários fatores.

### **3.5.1.2 Fatores que afetam comportamento dos microrganismos durante o congelamento**

Os principais fatores que afetam a resistência ou a susceptibilidade dos microrganismos durante o congelamento são:

- a) velocidade de congelamento: o congelamento rápido é menos prejudicial para as células dos microrganismos que o congelamento lento (Geiges, 1996). No congelamento rápido a temperatura do alimento é reduzida para  $-18^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  em 30 minutos, o que favorece a formação de pequenos cristais de gelo, porém no congelamento lento (*freezer* doméstico) onde a temperatura é atingida em 3 a 72 horas, ocorre a formação de grandes cristais de gelo (Jay, 2000). A formação de grandes cristais de gelo causa danos mecânicos na célula microbiana (Delazari, 1980).
- b) Temperatura de congelamento: as temperaturas de congelamento muito baixas como  $-20^{\circ}\text{C}$  são menos prejudiciais para os microrganismos do que temperaturas médias como  $-10^{\circ}\text{C}$  (Geiges, 1996; Jay, 2000). Na maioria dos casos, para temperaturas abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$ , quanto mais baixas, menos efetivas se tornam em relação à destruição de microrganismos (Delazari, 1980). Mais microrganismos são destruídos a  $-4^{\circ}\text{C}$  do

que a  $-15^{\circ}\text{C}$  ou menos, sendo que temperaturas abaixo de  $-24^{\circ}\text{C}$  parecem não ter nenhum efeito significativo (Jay, 2000). A razão pela qual as temperaturas superiores a  $-10^{\circ}\text{C}$  são mais letais para os microrganismos, parece estar relacionada com o processo de desnaturação das proteínas, que é menos intenso a temperaturas mais baixas (Delazari, 1980).

- c) Tempo de congelamento: a influência do tempo de congelamento no comportamento dos microrganismos é bem conhecida e alguns estudos têm demonstrado que a maior parte dos danos e morte das células ocorre no início do período de congelamento, ou seja nas duas primeiras semanas (Speck & Ray, 1977; Delazari, 1980).
- d) Velocidade e temperatura de descongelamento: o processo de descongelamento é importante na sobrevivência dos microrganismos. Quanto mais rápido for o descongelamento, maior o número de microrganismos sobreviventes (Geiges, 1996; Jay, 2000). Além disso repetidos ciclos de congelamento e descongelamento podem causar a destruição das células devido à ruptura da membrana celular (Yamamoto & Harris, 2001).
- e) Características do alimento: a composição do alimento pode aumentar ou diminuir a resistência dos microrganismos ao congelamento. De maneira geral, a resistência diminui em alimentos que contenham íons, sais orgânicos e ácidos (Delazari, 1980; Demchick et al., 1982). E aumenta em alimentos ricos em

proteína, lipídios e carboidratos, pois estes constituintes exercem um efeito crioprotetor nas células microbianas (Delazari, 1980; Palumbo & Williams, 1991; Geiges, 1996, Jay, 2000, Archer, 2004). Alguns autores sugerem que este efeito protetor deve-se ao fato de que os componentes se ligam à água, diminuindo a formação de cristais de gelo ou, envolvem a superfície da célula, protegendo-a (Morichi et al., 1963; El-Kest & Marth, 1992). Além dos constituintes naturalmente presentes nos alimentos, alguns aditivos também podem conferir este efeito (Archer, 2004).

- f) Tipo de bactéria: de modo geral, as bactérias Gram negativas são mais sensíveis ao congelamento do que as Gram positivas (Speck & Ray, 1977; Farrel & Upton, 1978; Delazari, 1980). Os endosporos e as toxinas dos microrganismos, aparentemente, não são afetadas por temperaturas de congelamento (Georgala & Hurst, 1963).
- g) Fase de crescimento da bactéria: bactérias na fase estacionária de crescimento apresentam maior resistência ao congelamento do que bactérias na fase logarítmica de crescimento (Mackey et al., 1980; Geiges, 1996).

O grande número de fatores que influenciam no comportamento dos microrganismos durante o congelamento dificultam o estabelecimento de um padrão de comportamento o qual seja expressado por todos os microrganismos. Dessa forma, são necessárias pesquisas específicas para determinar as condições apropriadas de congelamento, levando em

consideração as características do alimento e dos microrganismos presentes no mesmo.

### **3.5.1.3 Mecanismos de resistência dos microrganismos ao congelamento**

Alguns microrganismos desenvolvem certos mecanismos de resistência como resposta ao choque frio e esses são citados abaixo:

- 1) modificações na composição de ácidos graxos da membrana citoplasmática;
- 2) produção de proteínas de choque frio (CSP – *cold shock proteins*);
- 3) absorção de solutos como betaína, prolina e carnitina, os quais funcionam como osmoprotetores (Forsythe, 2000).

Entre os principais mecanismos, a produção de CSP e as modificações nos ácidos graxos da membrana são os mais estudados até o momento.

Os microrganismos modificam a composição de ácidos graxos da membrana citoplasmática com a finalidade de manter a sua fluidez e funcionalidade, características estas necessárias para a sobrevivência e crescimento dos mesmos. Normalmente, ocorrem alterações tais como:

- a) aumento da quantidade de ácidos graxos insaturados, acompanhada ou não da diminuição dos saturados; sendo que insaturações *cis* contribuem mais para o aumento da fluidez do que as insaturações *trans*.

- b) aumento na quantidade de ramificações *anteiso* e *iso*, com as *anteiso* contribuindo mais do que as *iso*;
- c) diminuição no tamanho da cadeia de ácidos graxos (Russel, 1989).

A contribuição de cada uma destas alterações para o aumento da fluidez, ocorre na seguinte ordem decrescente de importância: aumento de insaturações *cis*, aumento de ramificações *anteiso* e *iso*, aumento nas insaturações *trans* e, por último, a diminuição do tamanho da cadeia (Russel, 2002).

Cada microrganismo possui uma composição de lipídios na membrana, a qual está adaptada à faixa de temperatura particular de crescimento. O mesmo nível de fluidez da membrana pode ser mantido por diferentes combinações de ácidos graxos, portanto bactérias com comportamento similar em baixas temperaturas podem ter uma composição lipídica muito diferente. Estas diferenças podem ser influenciadas por diferenças filogenéticas, por capacidades metabólicas distintas e por interações lipídio-proteína específicas de cada bactéria (Russel, 2002).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Instalações**

O armazenamento das amostras de hambúrguer de frango e as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS). A extração de ácidos graxos das culturas bacterianas e a análise cromatográfica dos mesmos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do ICTA/UFRGS e no Laboratório de Equipamentos Especiais do ICTA/UFRGS, respectivamente.

### **4.2 Meios de cultura, diluentes e reagentes**

Os meios de cultura e diluentes utilizados foram da Merck (Darmstad, Alemanha), da Oxoid (Basingstoke, Inglaterra) ou da Difco (Detroit, EUA) e os reagentes da Merck (Darmstad, Alemanha) e da Nuclear (Diadema, São Paulo). A composição e o modo de preparo dos meios de cultura, dos diluentes e soluções utilizadas neste trabalho estão descritos no Apêndice 1.

### **4.3 Seleção e armazenamento dos hambúrgueres de frango**

Os hambúrgueres de frango utilizados neste trabalho foram hambúrgueres crus comercializados congelados, de uma mesma marca comercial. A composição dos hambúrgueres utilizados, conforme informação do fabricante, era de 10,7% de gorduras totais, 17,9% de proteínas, 1,8% de carboidratos, 0,8% de sódio e porcentagens menores de ferro e cálcio. Os hambúrgueres foram comprados em supermercados de Porto Alegre–RS, sendo que no momento da compra o estado de congelamento dos mesmos foi avaliado sensorialmente (visão e tato). Os hambúrgueres foram imediatamente transportados para o laboratório em caixas isotérmicas e armazenados em *freezer* a  $-18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  até o momento dos experimentos. A temperatura do *freezer* utilizado foi monitorada diariamente, durante todo o período de armazenamento, através de um termômetro de mercúrio (Incoterm, Porto Alegre, Brasil).

### **4.4 Avaliação da qualidade microbiológica dos hambúrgueres**

Antes dos experimentos que envolveram a contaminação artificial dos hambúrgueres, a presença de *Salmonella* spp. e a quantificação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram avaliadas em um hambúrguer de frango (56g) de cada uma das caixas utilizadas, as quais continham 12 hambúrgueres cada uma. As avaliações microbiológicas foram realizadas segundo os métodos recomendados por FDA (1992). As caixas que continham amostra contaminada com *Salmonella* spp., *Escherichia coli* ou *Staphylococcus*



*aureus* não foram utilizadas nos experimentos, sendo que novas caixas de lotes diferentes foram compradas e analisadas novamente.

#### 4.5 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho e as suas fontes estão apresentadas na Tabela 1. As linhagens utilizadas foram obtidas da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do ICTA/UFRGS, com exceção da cultura de *Escherichia coli* (ECHC), a qual foi gentilmente cedida pelo Dr. Delmar Bizani (Laboratório de Bioquímica de Alimentos do ICTA/UFRGS).

**TABELA 1:** Linhagens bacterianas utilizadas e suas fontes

<b>Linhagem</b>	<b>Fonte</b>
<i>Escherichia coli</i> (ECHC)	Isolada de cistite humana
<i>Staphylococcus aureus</i> (SAFH)	Isolada da cavidade nasal de um manipulador de alimentos
<i>Salmonella</i> Enteritidis (SE86)	Isolada de alimento envolvido em surto de salmonelose
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25972
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 13076

#### 4.6 Preparo dos Inóculos

Antes de cada experimento, as culturas que estavam armazenadas em glicerol a  $-15^{\circ}\text{C}$ , foram transferidas para caldo Infusão de Cérebro e Coração - BHI (Merck) e incubadas com agitação a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 18-24h.

Para avaliar a pureza das culturas foi realizado o isolamento por esgotamento em ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI), coloração de Gram e as provas bioquímicas específicas para cada microrganismo, segundo FDA (1992). As provas bioquímicas utilizadas estão apresentadas na Tabela 2.

**TABELA 2:** Provas bioquímicas utilizadas para avaliar a pureza das culturas bacterianas

Microrganismo	Provas bioquímicas
<i>Escherichia coli</i>	Produção de indol Vermelho de metila (VM) Voges-Proskauer (VP) Citrato
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coagulase
<i>Salmonella</i> spp.	Ágar três açúcares e ferro (TSI) Ágar lisina e ferro (LIA)

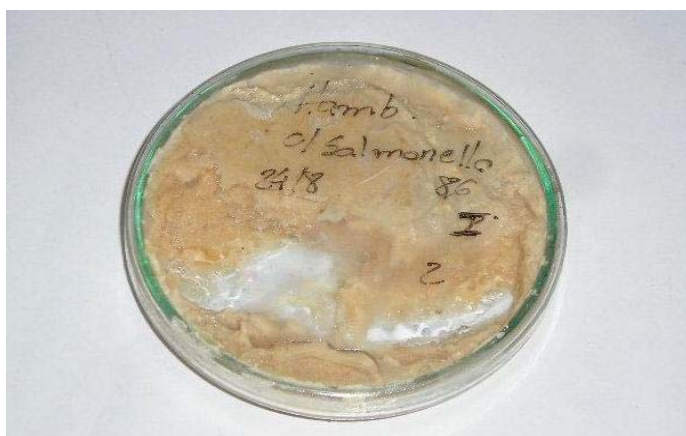
Foi realizada também a quantificação das culturas puras em placas com ágar Padrão para Contagem – PCA (Oxoid), para que a partir desta quantificação fosse estabelecida a diluição utilizada para o inóculo .

As culturas puras foram novamente ativadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração – BHI, com incubação/agitação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18-24h. Depois de ativadas as culturas foram diluídas 1:10 em água peptonada 0,1%, de forma que fosse obtida uma concentração de células de aproximadamente  $7 \log_{10}$

UFC/ml. O número de células dos inóculos foram confirmados através do cultivo em placa com ágar BHI.

#### 4.7 Contaminação dos hambúrgueres de frango

No interior de uma câmara de fluxo laminar, os hambúrgueres (56g), foram descongelados em temperatura ambiente, por 30 minutos, colocados em um Becker de 500mL estéril e foram inoculados com 5,6mL da suspensão de células de *Escherichia coli* (ECHC), *Staphylococcus aureus* (SAFH) e de *Salmonella* Enteritidis (SE86), contendo aproximadamente  $7 \log_{10}$  UFC/ml. Cada microrganismo foi inoculado separadamente e os inóculos foram misturados na massa de hambúrguer com o auxílio de uma espátula estéril. Os hambúrgueres contaminados foram transferidos e enformados em placas de Petri estéreis (Figura 2). Foi separada uma amostra para quantificação dos microrganismos no tempo 0 (sem armazenamento congelado) e as demais placas foram armazenadas em *freezer* a  $-18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 28 dias. A temperatura do *freezer* foi monitorada diariamente, durante todo o período de armazenamento, utilizando-se um termômetro de mercúrio (Incoterm).



**FIGURA 2:** Hambúrguer de frango contaminado com *S. Enteritidis*

#### **4.8 Avaliação da sobrevivência dos microrganismos em hambúrguer de frango durante o armazenamento a -18°C**

Para avaliar a sobrevivência dos microrganismos durante o armazenamento a -18°C foram coletadas porções de hambúrguer contaminado e analisadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

A porção equivalente a um hambúrguer (56g) foi descongelada em temperatura ambiente por 30 minutos, no interior de uma câmara de fluxo laminar, e então procedeu-se a pesagem assepticamente, de uma amostra de 25g (para análise de *E. coli* e *S. Enteritidis*) e de 10g (para análise de *S. aureus*). Estas amostras foram acondicionadas em saco plástico estéril e homogeneizadas em 225mL ou 90mL de água peptonada 0,1% estéril em um homogeneizador tipo “stomacher”, obtendo-se dessa maneira a diluição 1:10, a partir da qual foram preparadas as diluições decimais subseqüentes com água peptonada 0,1% para as amostras contaminadas com *E. coli* e *S. aureus* e com água peptonada tamponada 1,0% para amostras contaminadas com *S. Enteritidis*.

As amostras de hambúrguer diluídas foram semeadas nos meios de cultura específicos para cada um dos microrganismos estudados neste trabalho.

##### **4.8.1 Contagem de *Escherichia coli***

Para essa contagem utilizou-se o ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile – VRBA (Oxoid) com a técnica de semeadura em profundidade com sobrecamada.

Adicionou-se 1mL das diluições em placas de Petri estéreis e misturou-se com aproximadamente 15mL de VRBA, previamente dissolvido e resfriado a 45°C. Após a solidificação, uma sobrecamada de 3-4mL do mesmo meio foi adicionada. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 44-45°C por 24 horas. Após o período de incubação foi realizada a contagem apenas das placas que continham de 25 a 250 colônias típicas de coliformes fecais, ou seja que apresentavam colônias roxo-avermelhadas com diâmetro de 1,0mm ou mais e rodeadas por um halo de mesma coloração, diferenciando-se assim, das colônias típicas de coliformes não fecais nessa temperatura de incubação, as quais são pequenas (< 0,5mm) e sem halo (Klein & Fung, 1976).

#### **4.8.2 Contagem de *Staphylococcus aureus***

Para essa contagem foi utilizado o ágar Baird Parker (Merck), adicionado de emulsão de gema de ovo e solução de telurito de potássio 1%, com a técnica de semeadura em superfície.

Adicionou-se 0,1mL das diluições em placas contendo o ágar Baird Parker. As placas foram incubadas invertidas a 37°C durante 48 horas (FDA, 1992). Após o período de incubação foi realizada a contagem das placas contendo de 25 a 250 colônias típicas de *S. aureus*, ou seja, colônias convexas de 1-5mm de diâmetro, de cor preta com brilho, delimitada por uma borda opaca envolvida por uma zona clara de 2-5mm (Merck, 2000).

#### 4.8.3 Contagem de *Salmonella* Enteritidis

Para a contagem de *Salmonella* Enteritidis foi utilizado o método do Número mais Provável (NMP) descrito por Dufrene et al. (2001) com modificações, o qual é descrito a seguir.

Os 225mL das diluições  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ , foram distribuídos assepticamente em três tubos de 50mL, três tubos de 5mL e três tubos de 0,5mL, sendo que aos tubos de 0,5mL foram adicionados 5mL de água peptonada tamponada 1,0%. As séries de três tubos foram incubadas a 37°C por  $18 \pm 2$ h. Depois do período de incubação foi transferido 0,1mL de cada um dos tubos da série e colocado em tubos contendo 10mL de caldo Rappaport Vassiliadis, estes foram incubados a 42-43°C por 24 a 48h. Depois de 24h ou 48h os inóculos dos tubos que apresentaram crescimento foram semeados em estrias na superfície do ágar Verde Brilhante e incubados a 37°C por 24h.

Após o período de incubação, os tubos com crescimento e que apresentaram colônias típicas de *Salmonella* spp. no ágar Verde Brilhante, foram considerados positivos. A partir deste resultado o número de *Salmonella* Enteritidis foi calculado, utilizando-se uma tabela de NMP para combinações de três tubos e quantidades de amostra de 10,0; 1,0 e 0,1 mL, com intervalo de confiança de 95%, segundo recomendado pela FDA (1984) no Bacteriological Analytical Manual.

#### **4.9 Avaliação da influência do descongelamento do hambúrguer de frango na sobrevivência dos microrganismos**

Com o propósito de investigar se durante o descongelamento dos hambúrgueres artificialmente contaminados, houve crescimento ou morte dos microrganismos, foi realizada a contagem dos microrganismos durante o período de descongelamento.

Foi retirada do *freezer* uma amostra de hambúrguer artificialmente contaminada, a fim de serem realizadas contagens de cada um dos microrganismos, separadamente. As contagens foram feitas nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos de descongelamento em temperatura ambiente. As contagens de *S. aureus* (SAFH) e *E. coli* (ECHC) foram realizadas segundo os métodos recomendados por FDA (1992). Para a contagem de *S. Enteritidis* foi utilizado o método do Número mais Provável (NMP) descrito por Dufrene et al. (2001).

#### **4.10 Avaliação da sobrevivência dos microrganismos em água peptonada 0,1% durante o armazenamento a -18°C**

Para avaliar se os componentes do hambúrguer de frango (proteínas, gorduras, etc.) conferem algum efeito crioprotetor nas células dos microrganismos, os mesmos foram congelados em água peptonada 0,1% e as taxas de sobrevivência foram comparadas com a das células que foram inoculadas em hambúrguer de frango.

As culturas de *E. coli* (ECHC), *S. aureus* (SAHF), *E. coli* ATCC 25972 e *S. aureus* ATCC 25923 foram cultivadas, separadamente em 10mL de caldo BHI (Merck) a 37°C por 18-24h. Depois da incubação, as células foram

centrifugadas a 10.000rpm por 3min. e o sobrenadante foi removido. As células foram ressuspensas em 9mL de água peptonada 0,1% e diluídas até a obtenção de uma concentração final de aproximadamente  $6 \log_{10}$  UFC/mL. A concentração inicial de células nas culturas de cada microrganismo foi determinada anteriormente pela quantificação em placa com ágar BHI (Merck).

Foi transferido 1,0mL da suspensão de células com aproximadamente  $6 \log_{10}$  UFC/mL para nove tubos de micro-centrífuga de 1,5mL. Um tubo foi separado para ser realizada a quantificação no tempo zero (sem armazenamento congelado) e os demais tubos foram armazenados em *freezer* a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

As culturas de *S. Enteritidis* (SE86) e de *S. Enteritidis* ATCC 13076 foram submetidas aos mesmos procedimentos de cultivo e centrifugação, mas foram diluídas para obter uma concentração final de  $6 \log_{10}$  UFC/mL em nove frascos Erlenmeyers contendo 250mL de água peptonada 0,1%. Foi separado um frasco para ser realizada a quantificação no tempo zero (sem armazenamento congelado) e os demais frascos foram armazenados em *freezer* a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Para realizar a contagem do número de células de cada bactéria, foram retiradas amostras de 1mL (para *E.coli* e *S. aureus*) e 250mL (para *S. Enteritidis*) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, diluídas decimalmente em água peptonada 0,1 % (para *E.coli* e *S. aureus*) ou em água peptonada tamponada 1,0% (para *S. Enteritidis*) e semeadas nos meios de cultura específicos para cada microrganismo.



#### **4.10.1 Contagem de *Escherichia coli***

Para essa contagem utilizou-se o ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile – VRBA (Oxoid), com a técnica de semeadura em profundidade com sobrecamada, conforme já foi descrito no item 4.8.1.

#### **4.10.2 Contagem de *S. aureus***

Para essa contagem foi utilizado o ágar Baird Parker (Merck), adicionado de emulsão de gema de ovo e solução de telurito de potássio 1%, o mesmo utilizado para contagem deste microrganismo inoculado em hambúrguer de frango (item 4.8.2), porém a técnica de semeadura utilizada foi a técnica de gota, segundo Miles & Misra (1938).

As placas contendo o meio Baird Parker foram divididas em 6 partes iguais e em cada uma das partes foi inoculado 20 $\mu$ L da diluição. Esta técnica possibilita, portanto, que sejam semeadas duas diluições em triplicata em uma única placa. As placas depois de totalmente secas foram incubadas invertidas a 37°C por 48h. Depois do período de incubação foi realizada a contagem das colônias típicas de *S. aureus* (item 4.8.2) em cada uma das partes da placa. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) encontrado em cada parte, foi multiplicado por 50, para obter-se o número de UFC em 1mL.

#### **4.10.3 Contagem de *Salmonella Enteritidis***

Para a contagem de *Salmonella Enteritidis* foi utilizado o método do Número mais Provável (NMP) descrito por Dufrene et al. (2001), conforme já foi descrito no item 4.8.3.

#### **4.11 Análise da composição de ácido graxos**

Neste trabalho foi avaliado também se as bactérias estudadas desenvolveram resistência ao choque frio devido a alterações na composição de ácidos graxos das células bacterianas.

##### **4.11.1 Preparo das culturas para extração dos ácidos graxos**

As culturas puras de cada bactéria foram cultivadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração – BHI, com incubação/agitação a 37°C por 18-24h. Depois da incubação, um tubo contendo a cultura de cada bactéria foi separado para extração de ácidos graxos e outro tubo com a mesma bactéria foi armazenado em *freezer* a -18°C, por 24h.

Antes da extração de ácidos graxos, as suspensões de células foram transferidas para tubos de micro-centrífuga e centrifugadas a 10.000rpm, por 3min., sendo então lavadas duas vezes com solução salina 0,85%.

##### **4.11.2 Extração de ácidos graxos**

As células foram submetidas as reações de saponificação e metilação e os metil ésteres dos ácidos graxos foram extraídos, como descrito abaixo.

Depois da lavagem das células o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado, aos poucos, 2mL de metanol/NaOH (reagente 1). O precipitado juntamente com o reagente 1 foi transferido para um tubo de ensaio com tampa de *teflon*. Este tubo foi levado ao banho-maria a 100°C, por 5min. Em seguida, o tubo foi agitado em um agitador magnético e foi levado

novamente para o banho-maria, onde permaneceu por mais 25min, a 100°C. Depois deste período, o tubo foi retirado do banho-maria e foi deixado em temperatura ambiente até esfriar. Depois de resfriado foi adicionado ao tubo 4mL da solução metanol/HCl 6N (reagente 2) e este foi colocado no banho-maria a 80°C, por 15min. O tubo foi deixado em temperatura ambiente até esfriar e foi adicionado de 4mL da solução de hexano/éter metil *tert*-butil (reagente 3), sendo então agitado e, depois da separação das fases, removeu-se a fase superior. Esta fase foi transferida para outro tubo de ensaio e foram adicionados 4mL de NaOH 0,3M (reagente 4). Em seguida, esperou-se a separação de fases e removeu-se a fase de cima (solvente + ácidos graxos). Esta fase foi transferida para dois tubos de micro-centrífuga e estes foram deixados abertos em temperatura ambiente até que todo solvente fosse evaporado (Buyer, 2002).

Depois que o solvente evaporou os tubos foram fechados e armazenados em *freezer* até o momento da análise por cromatografia gasosa.

#### **4.11.3 Cromatografia gasosa**

As amostras contendo os metil ésteres de ácidos graxos foram dissolvidas em 10 $\mu$ L de hexano e 1 $\mu$ L foi injetado manualmente com micropipeta em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu (Japão) modelo GC14B. Foi utilizado um detector de ionização de chama (250°C) e a pressão aplicada foi de 100kPa. O gás de arraste foi o hidrogênio e a coluna utilizada foi uma DB1 com 30m de comprimento, 0,25mm de largura e 0,25 $\mu$ m de

espessura de filme. A temperatura de rampa foi de 150°C por 4min. até atingir 250°C com uma razão de 4°C/min.

A composição de ácidos graxos das bactérias estudadas foi determinada através da comparação dos tempos de retenção com um padrão. O padrão utilizado foi o Bacterial Acid Methyl Esters – BAME (Supelco, Bellefonte, EUA ).

A proporção de ácidos graxos de cada bactéria foi obtida a partir da área proporcional ao pico correspondente a cada ácido graxo.

#### **4.12 Análise Estatística**

Todos os experimentos realizados para avaliar a sobrevivência dos microrganismos foram repetidos, pelo menos duas vezes, sendo todos os resultados provenientes de contagens em triplicatas.

As contagens em UFC/g ou mL e em NMP/g ou mL obtidas em cada experimento foram transformadas em  $\log_{10}$ , antes de serem analisadas estatisticamente.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do Núcleo de Assistência Estatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizando o software “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS), versão 12.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Adotou-se o nível de significância de 5% em todo tratamento estatístico dos dados.

Para avaliar se houve variações estatisticamente significativas entre as contagens nos diferentes tempos de armazenamento congelado, entre os

dois meios de inoculação (água peptonada e hambúrguer de frango) e entre os microrganismos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas.

Através da análise de variância para medidas repetidas, avalia-se grupos de variáveis dependentes que representam medidas diferentes de um mesmo atributo, quando estas medidas são realizadas repetidas vezes para o mesmo caso. Utilizando este modelo pode-se investigar interações entre os fatores (tratamento), bem como, os efeitos de fatores individuais.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Qualidade microbiológica dos hambúrgueres de frango

A contaminação naturalmente presente nas amostras de hambúrguer de frango foi avaliada antes da sua utilização neste trabalho. Este procedimento foi realizado a fim de evitar possíveis interferências nos experimentos. Os resultados demonstraram que 50% das 12 amostras de hambúrguer testadas apresentaram contaminação com *S. aureus* ou representantes da família Micrococcaceae (Tabela 3). As amostras que apresentaram estas contaminações não foram utilizadas nos experimentos, uma vez que tais microrganismos poderiam crescer no meio de cultivo utilizado para o isolamento de *S. aureus*. Por não ser o objetivo deste trabalho, as bactérias contaminantes não foram identificadas completamente, sendo consideradas apenas como membros da família Micrococcaceae.

Dentre as 12 amostras analisadas, quatro apresentaram *S. aureus*, sendo que as contagens foram de  $1,2 \times 10^2$  a  $8,0 \times 10^2$  UFC/g. Tais valores são inferiores ao limite estabelecido para hambúrgueres pela legislação brasileira, Resolução RDC nº 12 de 2001 (Brasil, 2001), o qual é de  $5 \times 10^3$  UFC/g. Nas 12 amostras analisadas não foi encontrada contaminação por *Salmonella* spp. ou por coliformes fecais (*E. coli*).

O número expressivo de amostras (50%) com contaminação por bactérias da família Micrococcaceae, provavelmente deve-se ao fato de que as indústrias não direcionam medidas específicas para o controle destes microrganismos, o que ocorre para outros microrganismos como o *S. aureus*, a *Salmonella* spp. e os coliformes fecais, exigidos pela legislação ou pelo mercado externo.

**TABELA 3: Qualidade microbiológica dos hambúrgueres de frango**

AMOSTRA	CONTAGENS (UFC/g)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Micrococcaceae
1	N.D	N.D	N.D	N.D
2	N.D	N.D	N.D	N.D
3	N.D	N.D	N.D	N.D
4	N.D	N.D	N.D	$1,1 \times 10^3$
5	N.D	N.D	N.D	$3,2 \times 10^4$
6	$1,2 \times 10^2$	N.D	N.D	$9,8 \times 10^2$
7	$3,8 \times 10^2$	N.D	N.D	$1,1 \times 10^3$
8	N.D	N.D	N.D	N.D
9	$6,5 \times 10^2$	N.D	N.D	$4,5 \times 10^3$
10	$8,0 \times 10^2$	N.D	N.D	$1,0 \times 10^3$
11	N.D	N.D	N.D	N.D
12	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D: Não detectado

## 5.2 Influência do descongelamento do hambúrguer de frango na sobrevivência dos microrganismos

Considerando que o descongelamento do hambúrguer de frango foi necessário para uma melhor homogeneização da amostra com o diluente, o comportamento dos microrganismos durante o período de 30 minutos de descongelamento em temperatura ambiente foi avaliado.

Os resultados encontrados demonstraram que não houve multiplicação ou morte expressiva dos microrganismos durante o período de descongelamento do hambúrguer de frango, uma vez que não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as contagens durante o período de descongelamento (Tabela 4). Com base nesses resultados, pode-se dizer que as diferenças encontradas entre as contagens obtidas nos diversos tempos de armazenamento congelado não foram influenciadas pelos períodos de descongelamento.

**TABELA 4:** Contagens de *S. aureus* (SAFH), *E. coli* (ECHC) e *S. Enteritidis* (SE86) durante o descongelamento de hambúrguer de frango, em temperatura ambiente

Tempo de descongelamento	Contagens*		
	<i>S. aureus</i> (SAFH)	<i>E. coli</i> (ECHC)	<i>S. Enteritidis</i> (SE86)
0	5,90 <sup>a</sup>	4,66 <sup>b</sup>	6,95 <sup>c</sup>
10	6,20 <sup>a</sup>	4,63 <sup>b</sup>	7,15 <sup>c</sup>
20	6,28 <sup>a</sup>	4,69 <sup>b</sup>	7,04 <sup>c</sup>
30	5,99 <sup>a</sup>	4,64 <sup>b</sup>	6,95 <sup>c</sup>

\* Os valores representam a média de dois experimentos com contagens em triplicatas.

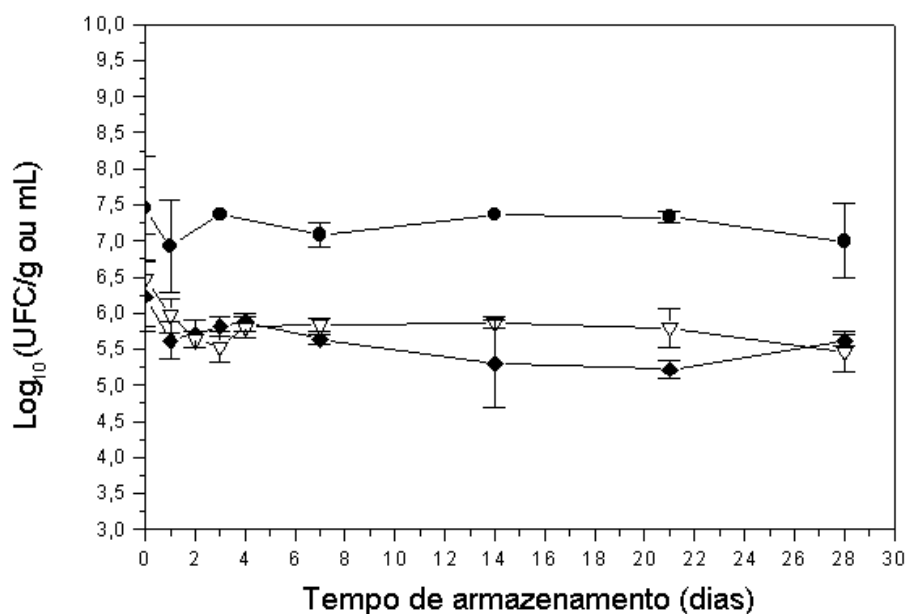
<sup>a, b, c</sup> Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $P>0,05$ ).



### 5.3 Sobrevivência dos microrganismos em hambúrguer de frango durante o armazenamento a -18°C

Foram observadas reduções nas populações de todas as bactérias testadas, contudo um elevado número de sobreviventes foi encontrado mesmo depois de 28 dias de armazenamento a -18°C.

De modo geral, observou-se uma redução média de menos de 1 unidade logarítmica ( $\log_{10}$ ) no número de células artificialmente inoculadas nos hambúrgueres de frango (Figura 3).



**FIGURA 3:** Sobrevivência de *E. coli* ECHC (◆), *S. Enteritidis* SE86 (●) e *S. aureus* SAFH (▽) em hambúrguer de frango armazenado -18°C por 28 dias.

A população inicial de *E. coli* (ECHC) de  $6,23 \pm 0,48 \log_{10}$  UFC/g, apresentou uma redução média de  $0,63 \log_{10}$  UFC/g, depois de 28 dias de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  (Tabela 5). Resultados similares foram encontrados por Doyle & Schoeni (1984), quando investigaram a sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 em hambúrguer bovino armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por 9 meses. Estes pesquisadores observaram uma redução de  $0,50 \log_{10}$  UFC/g na população inicial de aproximadamente  $6,70 \log_{10}$  UFC/g. Da mesma forma, Sage & Inghan (1998) demonstraram reduções de 0,62 a  $2,52 \log_{10}$  UFC/g na população de  $6,00 \log_{10}$  UFC/g de *E. coli* O157:H7 inoculada em hambúrguer bovino congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas.

**TABELA 5** : Reduções no número de células de *E. coli*, *S. aureus* e *S. Enteritidis* em hambúrguer de frango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por 28 dias

Tempo de armazenamento	Redução* ( $\log_{10}$ UFC/g ou NMP/g)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Enteritidis</i>
1	0,61	0,50	0,53
2	0,52	0,83	-
3	0,41	0,93	0,10
4	0,35	0,66	-
7	0,59	0,63	0,37
14	0,94	0,59	0,10
21	1,01	0,67	0,13
28	0,61	0,99	0,46
<b>Média</b>	<b>0,63<sup>a</sup></b>	<b>0,73<sup>a</sup></b>	<b>0,26<sup>b</sup></b>

\* As reduções foram calculadas comparando as contagens em cada tempo de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  com as contagens iniciais (tempo zero).

<sup>a,b</sup> Valores com letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) entre si.

A população inicial de *S. aureus* (SAFH) de  $6,46 \pm 0,64 \log_{10}$  UFC/g, demonstrou uma redução média de  $0,73 \log_{10}$  UFC/g (Tabela 5). Resultados similares foram apresentados por Teagasc (1997), avaliando a sobrevivência de *S. aureus* em carne moída congelada a  $-35^{\circ}\text{C}$ , durante 10 semanas. Esse autor encontrou uma redução de  $0,66 \log_{10}$  UFC/g na população inicial, a qual era de aproximadamente  $6,00 \log_{10}$  UFC/g.

Neste trabalho, observou-se uma redução de apenas  $0,26 \log_{10}$  NMP/g na população inicial de  $7,46 \pm 0,71 \log_{10}$  NMP/g de *S. Enteritidis* congelada em hambúrguer de frango (Tabela 5). De acordo com Raj & Liston (1961), *Salmonella* spp. são conhecidas pela sua tolerância ao congelamento. Como exemplo disso, *S. Typhimurium* demonstrou grande estabilidade quando inoculada em peixe congelado a  $-17,9^{\circ}\text{C}$  por mais de um ano. Esse microrganismo também mostrou ser resistente ao congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  em hambúrguer bovino, mas foi muito susceptível a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento (Georgala & Hurst, 1963). Por outro lado, reduções maiores a aquelas encontradas neste trabalho foram demonstradas por outros pesquisadores, por exemplo: Teagasc (1997) encontrou uma redução de  $0,88 \log_{10}$  NMP/g na população de *Salmonella* Kentucky congelada em carne moída a  $-35^{\circ}\text{C}$ , por 10 semanas. Um decréscimo maior ainda foi encontrado por Escartin et al. (2000) quando estudaram a redução no número de *Salmonella* spp. em carne suína congelada a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Estes pesquisadores encontraram uma redução de  $3,00 \log_{10}$  NMP/g, depois de 78 semanas de congelamento.

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as reduções médias de *S. aureus* (SAFH) e de *E. coli* (ECHC). Apenas a redução do número de *S. Enteritidis* (SE86) diferiu significativamente das demais, uma vez que foi o microrganismo que demonstrou a menor taxa de redução encontrada no nosso trabalho. Considerando que esta bactéria foi isolada de um alimento envolvido em surto de salmonelose e que de acordo com Geimba et al. (2004), esta linhagem apresenta características genotípicas específicas de *S. Enteritidis* assumidas como virulentas isoladas no Rio Grande do Sul, a resistência ao congelamento pode estar relacionada com as propriedades de virulência desse microrganismo.

Se forem analisadas as reduções encontradas nos microrganismos inoculados em hambúrgueres, pode-se dizer que tais resultados contrariam o bem conhecido pressuposto de que bactérias Gram negativas sobrevivem menos ao congelamento que Gram positivas (Speck & Ray, 1977, Sheridan 1982, Lund, 2000). No entanto, Archer (2004) tem demonstrado que algumas bactérias Gram negativas podem sobreviver bem em alimentos congelados, dependendo da composição da matriz do alimento e de outros fatores, justificando assim, que patógenos alimentares Gram negativos estejam associados a grande maioria dos surtos de toxinfecções relacionados com o consumo de alimentos congelados.

#### 5.4 Sobrevivência dos microrganismos em água peptonada 0,1% durante o armazenamento a -18°C

A população inicial de *E. coli* (EHC), a qual era de  $5,46 \pm 0,31$   $\log_{10}$  UFC/mL, apresentou redução média de  $1,63 \log_{10}$  UFC/mL, enquanto que a contagem inicial de *S. aureus* (SAFH) de  $6,30 \pm 0,06 \log_{10}$  UFC/mL foi reduzida em  $1,34 \log_{10}$  UFC/mL. A população de *S. Enteritidis* (SE86), inicialmente apresentando contagens médias de  $6,63 \pm 0,00 \log_{10}$  NMP/mL, demonstrou redução média de  $0,85 \log_{10}$  NMP/mL (Tabela 6).

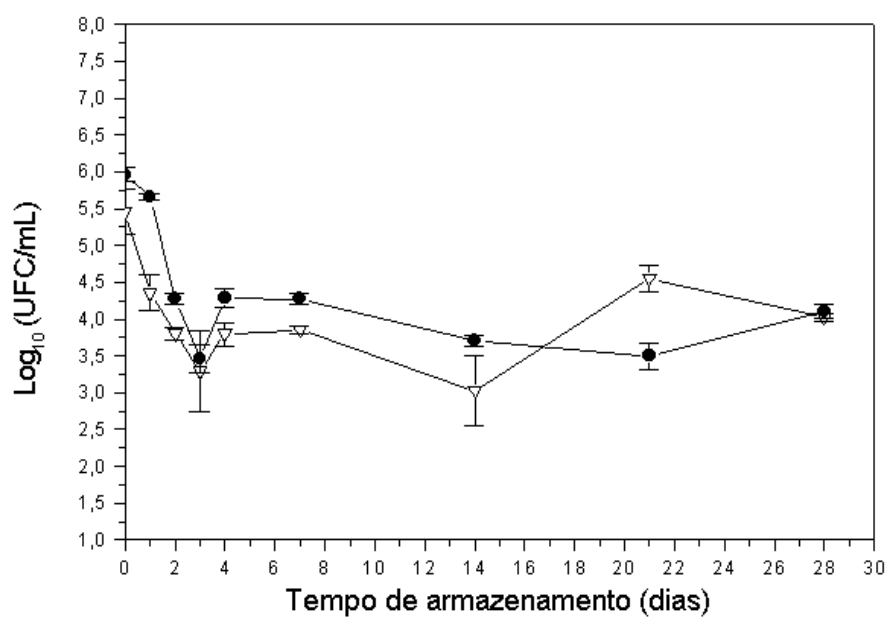
*E. coli* ATCC 25972 apresentou uma redução média de  $1,81 \log_{10}$  UFC/mL na sua população inicial que era de  $5,96 \pm 0,10 \log_{10}$  UFC/mL, enquanto que a população inicial de *S. aureus* ATCC 25923 de  $5,19 \pm 0,02 \log_{10}$  UFC/mL foi reduzida em  $0,97 \log_{10}$  UFC/mL. A contagem inicial de *S. Enteritidis* ATCC 13076 de  $6,36 \pm 0,01 \log_{10}$  NMP/mL, demonstrou uma redução média de  $1,08 \log_{10}$  NMP/mL (Tabela 6).

Quando a sobrevivência dos isolados das três bactérias EHC, SAFH, SE86 foi comparada com os isolados ATCC, em água peptonada 0,1% (Figuras 4, 5 e 6), observou-se que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre *E. coli* (EHC) e *E. coli* ATCC 25972 e também entre *S. aureus* (SAFH) e *S. aureus* ATCC 25923. Contudo, houve diferença significativa entre *S. Enteritidis* (SE86) e *S. Enteritidis* ATCC 13076.

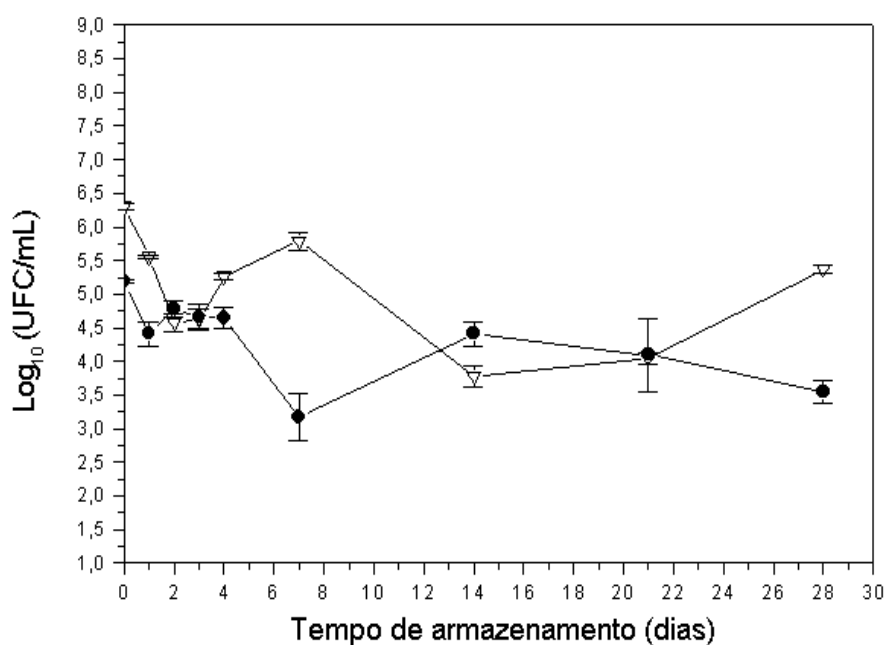
**TABELA 6. :** Reduções no número de células de *E. coli* (ECHC e ATCC 25972), *S. aureus* (SAFH e ATCC 25923) e *S. Enteritidis* (SE86 e ATCC 13076) armazenadas a -18°C em água peptonada 0,1% por 28 dias

Tempo de congelamento	Reduções* (log <sub>10</sub> UFC/mL ou NMP/mL)					
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. Enteritidis</i>	
	ECHC	ATCC 25972	SAFH	ATCC 25923	SE86	ATCC 13076
1	1,11	0,30	0,75	0,77	0,27	0,41
2	1,66	1,68	1,73	0,41	-	-
3	2,17	2,50	1,68	0,52	0,68	0
4	1,66	1,68	1,04	0,54	-	-
7	1,61	1,69	0,51	2,01	2,03	0,41
14	2,44	2,26	2,53	0,77	0,25	1,00
21	0,91	2,46	2,26	1,09	0,59	1,89
28	1,44	1,86	0,93	1,64	1,27	2,76
<b>Média</b>	<b>1,63</b>	<b>1,81</b>	<b>1,34</b>	<b>0,97</b>	<b>0,85</b>	<b>1,08</b>

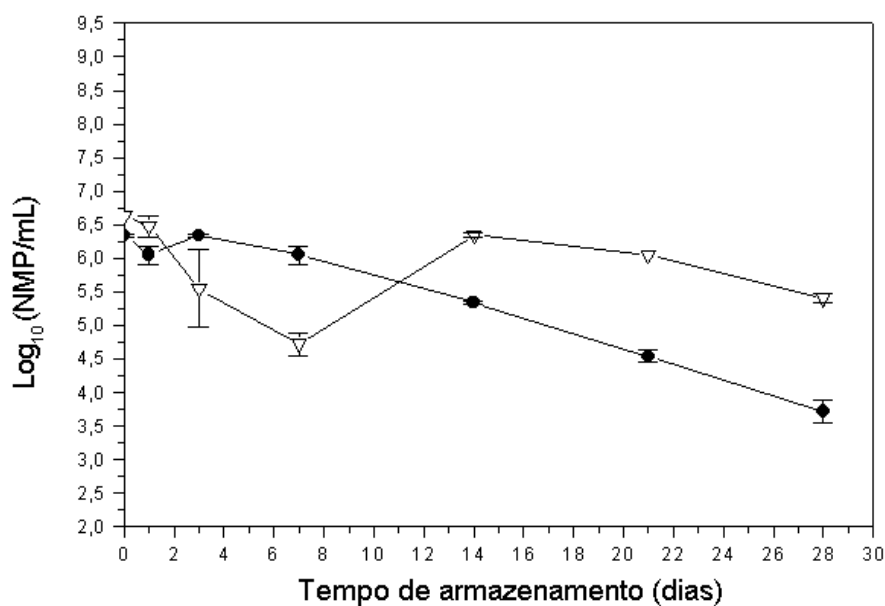
\* As reduções foram calculadas comparando as contagens em cada tempo de armazenamento a -18°C com as contagens iniciais (tempo zero).



**FIGURA 4:** Sobrevivência de *E. coli* ECHC (▽) e *E. coli* ATCC 25972 (●), em água peptonada 0,1%, durante armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 28 dias.



**FIGURA 5:** Sobrevivência de *S. aureus* SAFH (▽) e *S. aureus* ATCC 25923 (●) em água peptonada 0,1%, durante o armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 28 dias.

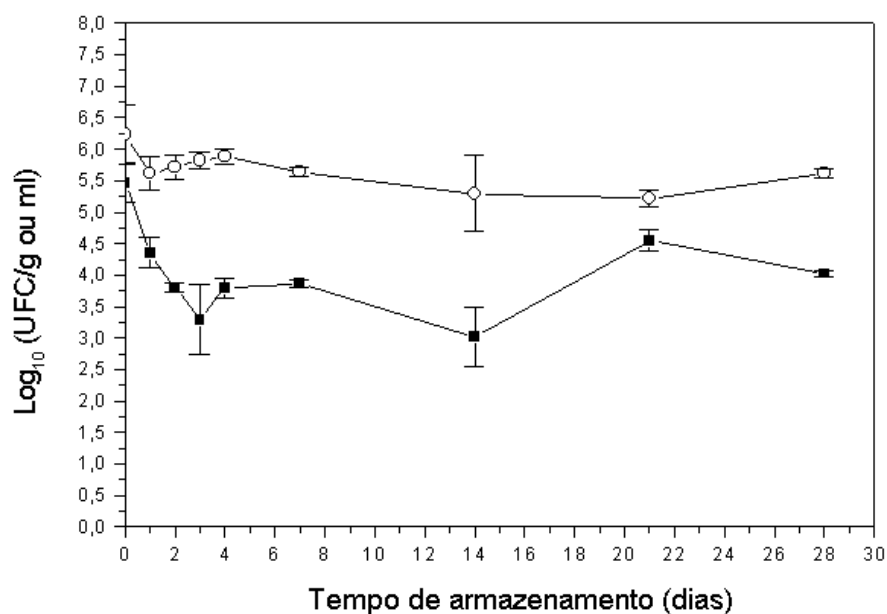


**FIGURA 6:** Sobrevivência de *S. Enteritidis* SE86 (∇) e *S. Enteritidis* ATCC 13076 (●) em água peptonada 0,1% durante o armazenamento a -18°C por 28 dias

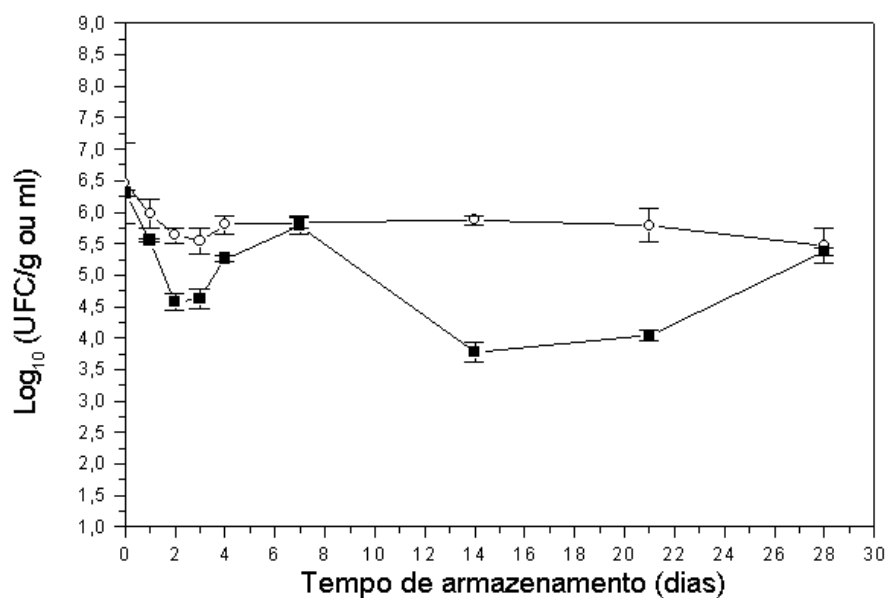
### 5.5 Comparação da sobrevivência dos microrganismos em água peptonada com a sobrevivência em hambúrguer de frango

As reduções obtidas para cada microrganismo em água peptonada 0,1% foram significativamente ( $P < 0,05$ ) maiores do que as reduções observadas em hambúrguer de frango. Isto pode ser observado nas figuras 7, 8 e 9 que mostram uma comparação entre a sobrevivência de cada uma das bactérias em hambúrguer de frango e em água peptonada 0,1%.

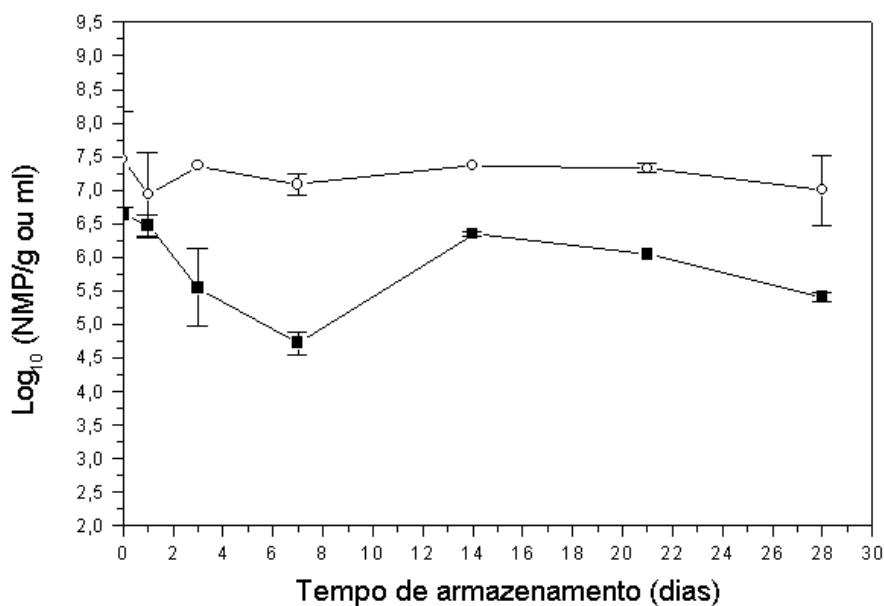




**FIGURA 7:** Sobrevivência de *E. coli* ECHC em hambúrguer de frango (o) e em água peptonada 0,1% (■), durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.



**FIGURA 8:** Sobrevivência de *S. aureus* SAFH em hambúrguer de frango (o) e em água peptonada 0,1% (■), durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.



**FIGURA 9:** Sobrevivência de *S. Enteritidis* SE86 em hambúrguer de frango (o) e em água peptonada 0,1% (■), durante o armazenamento a -18°C por 28 dias.

Estes resultados sugerem um efeito protetor dos componentes do hambúrguer sobre as células dos microrganismos testados. Teagasc (1997) demonstrou que *S. aureus* inoculado em carne moída com 5% de gordura sobreviveu menos (redução de 0,66 log<sub>10</sub> UFC/g) ao armazenamento congelado a -35°C do que em carne moída com 50% de gordura (redução de 0,47 log<sub>10</sub> UFC/g). Dykes & Moorhead (2001) constataram que a camada de gordura sub-cutânea da carne ofereceu proteção para diferentes bactérias durante o congelamento. No entanto, como esta proteção acontece ainda não está bem esclarecido (El-Kest & Marth, 1992; Archer, 2004).

Uma vez que na composição dos hambúrgueres utilizados, conforme informação do fabricante, os principais constituintes eram proteínas e gorduras,

as menores reduções verificadas nos hambúrgueres quando comparadas a aquelas em água peptonada podem estar relacionadas, mais provavelmente, ao efeito protetor destes dois constituintes. Contudo, demais estudos devem ser direcionados a fim de comprovar este efeito.

No presente trabalho, observou-se que a maior queda no número de células de todas as bactérias ocorreu nas primeiras duas semanas de congelamento (Figuras 7, 8 e 9), tanto em hambúrgueres quanto em água peptonada 0,1%. Após esse período, o número de células permaneceu praticamente inalterado. Outros autores também observaram que as maiores reduções na população de diferentes bactérias ocorreram no estágio inicial (1-2 semanas) de congelamento (Speck & Ray, 1977; Teagasc, 1997; Semanchek & Golden 1998).

### **5.6 Composição de ácidos graxos**

Neste trabalho foi avaliado também se as bactérias estudadas desenvolveram resistência ao choque frio devido a modificação da composição dos ácidos graxos nas células bacterianas.

A composição de ácido graxos majoritários das bactérias estudadas neste trabalho está apresentada na Tabela 7.

**Tabela 7:** Composição de ácidos graxos\* de *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* submetidas ou não ao armazenamento a -18°C

Bactéria	Tratamento/ Proporção de ácidos graxos (%)	
	Não Congelada	Congelada
<i>S. aureus</i> (SAFH)	-	<i>a</i> -C15:0 (34,3)
	-	C17:0Δ <i>cis</i> (14,6)
	C20:0 (16,7)	C20:0 (18,3)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	-	<i>a</i> -C15:0 (12,0)
	C16:0 (5,9)	-
	C20:0 (30,6)	C20:0 (25,8)
<i>E. coli</i> (ECHC)	C16:0 (3,8)	C16:0 (16,3)
	C20:0 (12,9)	C20:0 (15,5)
<i>E. coli</i> (ATCC 25972)	-	C14:0 (8,9)
	-	C16:0 (15,4)
	-	C17:0Δ <i>cis</i> (6,7)
	C18:1 <sup>2</sup> <i>cis</i> (6,2)	-
	C20:0 (41,3)	C20:0 (38,9)
<i>S. Enteritidis</i> (SE86)	<i>a</i> -C15:0 (16,3)	-
	C17:0Δ <i>cis</i> (6,2)	-
	C20:0 (64,2)	C20:0 (77,6)
<i>S. Enteritidis</i> (ATCC 13076)	-	C14:0 (7,7)
	<i>a</i> -C15:0 (21,3)	-
	-	C16:0 (23,4)
	C17:0Δ <i>cis</i> (10,7)	C17:0Δ <i>cis</i> (8,8)
	C20:0 (53,2)	C20:0 (19,7)

\* A composição corresponde a proporção dos ácidos graxos majoritários.

De forma geral, as principais alterações na composição dos ácidos graxos de um microrganismo submetido a baixas temperaturas ocorrem na membrana citoplasmática (Annous et al., 1997, Panoff et al., 1998, Chihib et al., 2003). Segundo Russel (2002), a alteração na composição de ácidos graxos

que mais contribui para manter a fluidez da membrana citoplasmática é o aumento na proporção de ácidos graxos com insaturações *cis*, seguida pelo aumento das ramificações *anteiso* e *iso*, aumento das insaturações *trans* e pela diminuição no tamanho da cadeia de ácidos graxos.

A composição dos ácidos graxos majoritários de *S. aureus* (SAFH) depois de congelado foi alterada com o surgimento de um ácido graxo *anteiso* (a-C15:0) e de um ácido graxo insaturado (C17:0 $\Delta$  *cis*), ambos em proporção expressiva, porém observou-se que a proporção de ácidos graxos saturados (C20:0) permaneceu praticamente inalterada depois do armazenamento a -18°C. Em *S. aureus* ATCC 25923 pode-se considerar que também houve uma mudança na composição de ácidos graxos, sendo que, neste caso ocorreu uma diminuição importante na proporção de ácidos graxos saturados (C16:0 e C20:0) acompanhada do aparecimento de um ácido graxo *anteiso* (a-C15:0). Estas alterações sugerem que *S. aureus* (SAFH) e *S. aureus* ATCC 25923 desenvolveram o mecanismo de alteração dos ácidos graxos, provavelmente da membrana citoplasmática, como resposta ao estresse causado pelo armazenamento congelado.

Chihib et al. (2003), em um estudo no qual avaliaram o perfil de ácidos graxos de duas linhagens de *L. monocytogenes* (Scott A e CNL 895807) quando incubadas em diferentes temperaturas, encontraram resultados semelhantes. Os pesquisadores observaram diferenças nas alterações dos ácidos graxos entre as duas linhagens. Nestas bactérias foi observado um aumento na quantidade de *anteiso*-C15:0 e um decréscimo na quantidade de *iso*-C15:0 quando a temperatura de incubação diminuiu de 37°C

para 4°C. Na linhagem Scott A houve um decréscimo na proporção de *anteiso*-C17:0, enquanto que na linhagem CNL ocorreu um aumento deste mesmo ácido graxo. No entanto, na *L. monocytogenes* CNL foi observado um decréscimo expressivo nos ácidos graxos saturados C14:0 e C16:0, o que não foi observado na linhagem Scott A.

Neste estudo, para *E.coli* (ECHC) observou-se apenas um aumento na proporção de ácidos graxos saturados (C16:0 e C20:0) depois do armazenamento a -18°C. E para *E. coli* ATCC 25972 um aumento na proporção total de ácidos graxos saturados (C14: 0 + C16:0 + C20:00) depois do armazenamento a -18°C, sendo que a proporção de ácidos graxos com insaturações *cis* praticamente não foi alterada. Estes resultados não permitem a compreensão do comportamento destes microrganismos durante o armazenamento congelado, com relação a sua composição de ácidos graxos.

*S. Enteritidis* (SE86) demonstrou neste trabalho, um aumento na proporção de ácidos graxos saturados (C20:0), acompanhado do desaparecimento de ácidos graxos com ramificações *anteiso* e de ácidos graxos com insaturações *cis*, depois do armazenamento a -18°C. Com base nestes resultados, pode-se sugerir que este microrganismo, o qual apresentou a maior taxa de sobrevivência durante o armazenamento congelado, principalmente em hambúrguer de frango, não utiliza o mecanismo de alteração da composição de ácidos graxos como principal modo de resistência ao armazenamento congelado, ou que as alterações ocorridas nos ácidos graxos deste microrganismo não puderam ser detectadas através da técnica de análise cromatográfica utilizada neste trabalho.

Para *S. Enteritidis* ATCC 13076 observou-se uma pequena redução na proporção de ácidos graxos saturados que era de 53,2% e depois do armazenamento a -18°C passou para 50,8% (C14:0 + C16:0 + C20:0). Esta redução de ácidos graxos saturados foi acompanhada da redução na proporção de ácidos graxos com insaturações *cis* (C17:0 $\Delta$  *cis*) e do desaparecimento do ácido graxo com ramificação *anteiso* (*a*-C15:0). A partir deste resultado não foi possível explicar o comportamento deste microrganismo durante o armazenamento congelado, com relação a composição de ácidos graxos.

Microrganismos psicotróficos freqüentemente se adaptam a ambientes frios através da alteração da composição de lipídios de membrana, mantendo a fluidez da mesma (Berry e Foegeding, 1997; Panoff et al., 1998). O aumento na proporção de ácidos graxos ramificados tem sido descrita durante a adaptação ao frio por linhagens de *Listeria monocytogenes* (Mazzotta e Montville, 1997) e *Bacillus cereus* (Abriouel et al., 2002). Entretanto, quando *E. coli* entra em fase estacionária, os ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios são convertidos em ciclopropanos derivados. Além disso, o fosfatidilglicerol é derivado para cardiolipina e para a síntese de mureína, além de componentes da membrana externa. Estas alterações contribuem para uma estrutura mais rígida, menos fluida, que se acredita “isolar” o microrganismo do ambiente desfavorável ao crescimento (DiRusso et al., 1999).

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que:

1- Houve redução nas populações de todas os microrganismos testados, contudo um elevado número de sobreviventes foi encontrado mesmo depois de 28 dias de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ ;

2- Quando os microrganismos foram congelados em hambúrguer de frango não houve diferença significativa entre as reduções médias de *S. aureus* (SAFH) e de *E. coli* (ECHC). Apenas a redução do número de *S. Enteritidis* (SE86) diferiu significativamente das demais, uma vez que este foi o microrganismo que demonstrou a menor taxa de redução encontrada neste trabalho;

3- As reduções obtidas para cada microrganismo em água peptonada 0,1% foram significativamente maiores do que as reduções observadas em hambúrguer de frango. Sugerindo portanto, a existência de um efeito protetor dos constituintes do hambúrguer de frango nas células dos microrganismos.



4- A redução mais pronunciada no número de células de todas as bactérias estudadas ocorreu nas primeiras duas semanas de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ , tanto em hambúrguer de frango quanto em água peptonada 0,1%;

5- Quando a sobrevivência dos isolados das três bactérias ECHC, SAFH, SE86 foi comparada com os isolados ATCC, em água peptonada 0,1%, houve diferença significativa apenas entre *S. Enteritidis* (SE86) e *S. Enteritidis* ATCC 13076.

6- Ocorreram alterações expressivas na composição de ácidos graxos de *S. aureus* (SAFH) e *S. aureus* ATCC 25923, o que pode indicar que estes microrganismos desenvolveram o mecanismo de alteração dos ácidos graxos como resposta ao estresse causado pelo armazenamento congelado.

7- Para *E. coli* (ECHC), *E. coli* ATCC 25972, *S. Enteritidis* (SE86) e *S. Enteritidis* ATCC 13076 as alterações na composição de ácidos graxos observadas não permitiram a compreensão do comportamento desses microrganismos durante o armazenamento congelado, com relação ao desenvolvimento desse mecanismo.

8 – O armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  não pode ser utilizado como uma estratégia para garantir a segurança microbiológica de hambúrguer de frango, sendo necessário portanto, minimizar a contaminação da matéria-prima e utilizar um tratamento térmico no produto antes do seu consumo. Considerando-se que a toxina estafilocócica uma vez formada, não será controlada pelo armazenamento congelado ou mesmo pelo tratamento térmico.

## 7. PERSPECTIVAS

Entre os possíveis desenvolvimentos futuros desta pesquisa estão:

- Conhecer melhor as interações existentes entre os constituintes do alimento e os microrganismos, a fim de avaliar os efeitos crioprotetores de cada constituinte sobre as células dos microrganismos durante o armazenamento congelado;

- Avaliar a influência de fatores como pH do alimento, fase de crescimento e método de detecção dos microrganismos, sobre a sobrevivência dos mesmos durante o armazenamento congelado;

- Avaliar a possibilidade dos microrganismos entrarem em estado viável mas não cultivável (VNC), devido ao estresse causado pelo armazenamento congelado;

- Aprofundar a investigação das alterações na composição de ácidos graxos e também os demais mecanismos de resistência ao armazenamento congelado, tais como produção de *cold shock proteins* e absorção de solutos como betaína, prolina e carnitina;

- Avaliar a sobrevivência dos microrganismos estudados neste trabalho e de demais microrganismos quando congelados em outros alimentos

tais como carcaças de frango, cortes de carne bovina e suína, vegetais minimamente processados, polpas de fruta, sorvete, entre outros.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIOUEL, H.; MAQUEDA, M.; GALVEZ, A. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.1473-1477, 2002.
- ANNOUS, B. A.; BECKER, L. A.; BAYLES, D. O. et al. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.3887-3894, 1997.
- ARCHER, D. L. Freezing: an underutilized food safety technology?. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p.127-138, 2004.
- ASTORGA, M. A. A.; CAPITA, R.; CALLEJA C. A. et al. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. **Meat Science**, Barking, v. 62, p.45-50, 2002.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p.33-40, 2001.
- BAUST, J. C. Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems. **Cryobiology**, San Diego, v. 10, p.197-201, 1963.
- BEAN, N. H.; GOULDING, J. S.; MATTHEW, T. D. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1988–1992. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p.1265–1286, 1997.
- BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **E. coli**: A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods. London: Blackie Academic and Professional, 1998. 200pp.
- BELONGIA, E. A.; MACDONALD, K. L.; PARHAM, K. E. et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.164, p.338-343, 1991.

BERRY, E. D.; FOEGEDING, P. M. Cold temperature and growth of microorganisms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p.1583-1594, 1997.

BLISKA, F. M. M. **Tendências do mercado da carne de aves**. In: SIMPÓSIO E WORKSHOP INDUSTRIALIZAÇÃO DAS CARNES DE AVES, 1997, Campinas, SP, Brasil. **Anais**. Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1997. p.1-10.

BOUVET, P. J. M.; FOUGERAT, I.; GUESNIER, F. et al. Human salmonellosis surveillance in France: recent data from the National Reference Center. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* & SALMONELLOSIS, 2002, St. Brieue, France. **Proceedings**. St. Brieue, France: AFSSA:INRA:InVS:Institut Pasteur:ISPAIA, 2002. p. 411-416.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 20, de 31 de julho de 2000. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndegas, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto**. Disponível em:

<[http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/InstrNorm20\\_2000htm](http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/InstrNorm20_2000htm)>. Acesso em: 20 set. 2000.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm) >. Acesso em: 17 dez. 2004.

BUYER, J. S. Rapid sample processing and fast gas chromatography for identification of bacteria by fatty acid analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.51, p.209-215, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to home-cooked hamburger - California, July 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 43, p. 213-216, 1994.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infection associated with eating raw ground beef - Wisconsin, December 1995. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 44, p. 905-908, 1995.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers – Colorado. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.46, p. 777-77, 1997.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Atlanta, 2002  
**Foodborne outbreaks bacterial.** Disponível em: <[http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us\\_outb/fbo2002/bacteria/02.htm](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo2002/bacteria/02.htm)>. Acesso em: 10 jan. 2005.

CHIHIB, N.; SILVA, M. R.; DELATTRE, G. et al. Different cellular fatty acids pattern behaviour of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.218, p.155-160, 2003.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 1-5, 2002.

D'AOUST, J. Y. Salmonella and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, p.11-31, 1994.

DELAZARI, I. Microbiologia de alimentos congelados. Efeitos do congelamento sobre os microrganismos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL**, Campinas, v.17, p. 15-30, 1980.

DEMCHICK, P. H.; PALUMBO, S. A.; SMITH, J. L. Influence of pH on freeze-thaw lethality in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Safety**, Westport, v.4, p.185-189, 1982.

DIRUSSO, C. C.; BLACK, P. N.; WEIMAR, J. D. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 38, p.129-197, 1999.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, p.289-302, 1991.

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

DUFRENE, J.; RITMEESTER, W.; ASCH, E. D. Quantification of the contamination of chicken and chicken products in the Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, p. 538-541, 2001.

DUITSCHAEVER, C. L.; BULLOCK, D. H.; ARNOTT, D. R. Bacteriological evaluation of retail ground beef, frozen beef patties and cooked hamburger. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.40, p.378-381, 1977.

DYKES, G. A.; MOORHEAD, S. M. Survival of three *Salmonella* serotypes on beef trimmings during simulated commercial freezing and frozen storage. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 21, p. 85-94, 2001.

EL-KEST, S. E.; MARTH, E. H. Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, p.639-648, 1992.

ESCARTIN, E. F.; LOZANO, J. S.; GARCIA, O. R. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 54, p. 19-25, 2000.

FARRELL, G. M.; UPTON, M. E. The effect of low temperature on the growth and survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* when inoculated on to bacon. **Journal of Food Technology**, Oxford, v.13, p.15-23, 1978.

FDA. Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 6. ed. Arlington, EUA, 1984. 495p.

FDA. Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 7. ed. Arlington, EUA, 1992. 529p.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**. London: Blackwel Science, 2000. 412p.

FOSTER, J. F.; FOWLER, J. L.; LADIGES, W. C. A bacteriological survey of raw ground beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.40, p.790-794, 1977.

GEIGES, O. Microbial process in frozen food. **Advance in Space Research**, Oxford, v.18, p.109-118, 1996.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; OLIVEIRA, F. A. et al. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* sp. isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, South of Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p.1229-1233, 2004.

GEORGALA, D. L.; HURST, A. The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 26, p. 346-358, 1963.

GLÓSNICKA, R.; KUNIKOWSKA, D. The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.19-30, 1994.

*Escherichia coli* O157:H7. Toxin-producing *E. coli* food poisoning and its prevention. **International of Food Safety News**, London, v.5, p.3-5, 1996.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 679p.

KLEIN, H.; FUNG, D. Y. C. Identification and quantification of fecal coliforms using violet red bile agar at elevated temperature. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.39, p.768-770, 1976.

LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; GUARD-PETTER, J. et al. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29, and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* & SALMONELLOSIS, 2002, St. Brieue, France. **Proceedings**. St. Brieue, France: AFSSA:INRA:InVS:Institut Pasteur:ISPAIA, 2002. p. 87–88.

LIN, A. W.; USERA, A. M.; BARRETT, T. J.; et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.870-876, 1996.

LUND, B. M. Freezing. In: LUND, B. M.; BAIRD PARKER, T. C.; GOULD, G. W. (Eds), **The Microbiological Safety and Quality of food**. Gaithersburg: Aspen publishers, 2000. v. 1. p. 122-145.

MAC-CORNAC, G. Pink yeast isolated from oysters grown at temperatures below freezing. **Commercial Fisheries Review**, Washington, v.12, p. 28-34, 1950.

MACKEY, B. M.; DERRICK, C. M.; THOMAS, J. A. The recovery of sub-lethally injured *Escherichia coli* from frozen meat. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.48, p. 315-324, 1980.

MARRIOTT, N. G.; GARCIA, R. A.; PULLEN, J. H. et al. Effect of thaw conditions on ground beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.43, p.180-184, 1980.

MAZZOTTA, A. S.; MONTVILLE, T. J. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p.32-38, 1997.

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

MENG, J., DOYLE, M.P. Microbiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. (Eds.), ***Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains**. Washington: American Society for Microbiology, 1998. p. 92-108.



MERCK. **Manual Merck**. Darmstedt, 2000. 407p.

MILLES, A. A. L.; MISRA, S. S. The estimation of bacterial prower of blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v.38, p.732-749, 1938.

MORICHI, T.; IRIE, R.; YANU, N. et al. Protective effect of glutamic acid and related compounds on bacterial cells subjected to freeze-drying. **Journal of General and Applied Microbiology**, Toquio, v.9, p.149-161, 1963.

MORITA, R. Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Review**, Baltimore, v.39, p.144-167, 1975.

MURESU, E.; PIANA, A.; AZARA, A. et al. Clonal relations among *Salmonella* Enteritidis phage type 3 outbreak isolates traced by DNA fingerprinting. **Microbiologica**, Pavia, v.24, p.371-377, 2001.

OLIVEIRA, L. A. T.; FERREIRA, T.; FRANCO, R. M. et al. Enumeração de *Escherihia coli* e *Enterococcus* em amostras de hambúrguer de frango, comercializados em Niterói – RJ. Avaliação da sensibilidade à antimicrobianos das cepas isoladas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 63, p.49-55, 1999.

PALUMBO, S. A.; WILLIAMS, A. C. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. **Food Microbiology**, London, v.8, p.63-68, 1991.

PANOFF, J. M.; THAMMAVONGS, B.; GUÉGUEN, M. et al. Cold shock responses in mesophilic bacteria. **Cryobiology**, San Diego, v.36, p.75-83, 1998.

PENNINGTON, H. Factors involved in recent outbreaks of *Escherichia coli*O157:H7 in scotland and recommendations for its control. **Journal of Food Safety**, Westport, v.18, p.383-391, 1998.

PERSSON, P. O.; LONDAHL, D. Freezing technology. In: MALLET, C. P. (Ed.), **Frozen Food Technology**. London: Blackie Academic and Professional, 1993. pp.20-58.

PEZZOTTI, G.; MIONI, R.; GRIMALD, M. et al. Valutazione microbiologica di carni bovine macinate e preparazioni di carni. **Ingegneria Alimentare le Conserve Animali**, Milano, v.2, p.18-26, 2001.

RABSCHA, W.; TSCHÄPEA, H.; BÄUMLERB, A. J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, Paris, v.3, p. 237-247, 2001.

RAJ, H.; LISTON, J. Survival of bacteria of public health significance in frozen sea foods. **Food Technology**, Chicago, v.15, p.429-434, 1961.

RANUCCI, D.; MIRAGLIA, D.; BRANCIARI, R. et al. Microbiological characteristics of hamburgers and raw pork sausages, and antibiotic-resistance of isolated bacteria. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.28, p.269-272, 2004.

RIO GRANDE DO SUL. SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE. Divisão de Vigilância Sanitária. **Relatórios Anuais de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Porto Alegre, 2001. 21p.

RUSSEL, N. J. Functions of lipids structural roles and membrane functions. In: RATHEDGE, C.; WILKINSON, S. C. (Eds.), **Microbial Lipids**. London: Academic Press, 1989. v.2. p.279-365.

RUSSEL, N. J. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.79, p.27-34, 2002.

SAGE, J. R.; INGHAM, S. C. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing in ground beef patties. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, p.1181-1183, 1998.

SEBRAE/SENAI. **Guia para Elaboração do Plano APPCC - Carnes e Derivados**. 2. ed. Brasília, DF, 2000. p.124.

SEMANCHEK, J. J.; GOLDEN, D. A. Influence of growth temperature on inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 by heat, acid and freezing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, p.395-401, 1998.

SHERIDAN, J. J. Survival of *Salmonella* kentucky in frozen minced pork, beef and lamb. **Irish Journal of Food Science and Technology**, Dublin, v.6, p.177-181, 1982.

SCHORR, H. Avicultura de corte: qual o modelo empresarial do futuro?. In: SIMPÓSIO E WORKSHOP INDUSTRIALIZAÇÃO DAS CARNES DE AVES, 1999, Campinas, SP, Brasil. **Anais**. Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1999. p.1-22.

SPECK, M.; RAY, B. Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.40, p.333-336, 1977.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J.L.; DRAKE, M. Development of a multiplex Polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, p.664-668, 2001.

TAMMINGA, S. K.; BEUMER, R. R.; KAMPELMACHER, E. H. Microbiological studies on hamburger. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v.88, p. 125-142, 1982.

TAMPLIM, M. L. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10°C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, p.1535-1540, 2002.

TEAGASC, J. J. S. The effect of freezing survival of pathogens in different meat types and the effect of varying lean fat ratios. **Hygiene Review**, London, 1997. Disponível em: <[http://www.sofht.co.uk/isfht/irish\\_97.freezing.htm](http://www.sofht.co.uk/isfht/irish_97.freezing.htm)>. Acesso em: 17 fev. 2003.

TIRADO, C.; SCHIMDT, K. Who surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. **Journal of Infection**, London, v.43, p. 80-84, 2001.

WACHSMUTH, I. K.; SPARLING, P. H.; BARRETT, T. J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the United States. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 18, p.233-239, 1997.

WIENZIRL, J.; GERDEMAN, A. E. The bacterial count of ice cream held at freezing temperatures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.12, p. 182-186, 1929.

WILLSHAW, G. A.; THIRLWELL, J.; JONES, A. P. et al. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.19, p.304-307, 1994.

YAMAMOTO, S. A.; HARRIS, L. J. The effects of freezing and thawing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 89-96, 2001.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.; STEWART, C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 168, p.227-233, 1998.

## **9. APÊNDICE**

## Apêndice 1

### Meios de cultura, diluentes e soluções utilizados neste trabalho

#### 1. Ágar Baird Parker

##### Composição do meio base (g/940mL)

Peptona de caseína	10,0g
Extrato de carne	5,0g
Extrato de levedura	1,0g
Piruvato de sódio	10,0g
Glicina	12,0g
Cloreto de lítio	5,0g
Ágar-ágar	15,0g

##### Suplemento (mL/940mL meio base)

Solução aquosa de telurito de potássio 1%	10,0mL
Emulsão de gema de ovo: salina (1:1 p/p)	50,0mL

##### Preparo

Dissolver 58g do meio base em 940mL de água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. Deixar esfriar até 45-50°C e adicionar o suplemento estéril. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final do meio base deve ser de  $6,8 \pm 0,2$ .

#### 2. Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI)

##### Composição (g/L)

Infusão de cérebro	200,0g
Infusão de coração	250,0g
Proteose peptona	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2,5g
Dextrose	2,0g
Ágar-ágar	15,0g

### Preparo

Dissolver 52g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deste meio deve ser  $7,4 \pm 0,2$ .

### 3. Ágar Lisina Ferro (LIA)

#### Composição (g/L)

Peptona de carne	5,0g
Extrato de levedura	3,0g
Dextrose	1,0g
Tiosulfato de sódio	0,04g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Púrpura de bromocresol	0,02g
Cloridrato de L-lisina	10,0g
Ágar-ágar	15,0g

#### Preparo

Dissolver 32g do ágar em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio (5,0mL/tubo) e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. Retirar da autoclave e inclinar os tubos até esfriar e solidificar o meio. O pH final deste meio deve ser  $6,7 \pm 0,2$ .

### 4. Ágar Padrão para Contagem (PCA)

#### Composição (g/L)

Peptona de caseína	5,0g
Extrato de levedura	2,5g
Dextrose	1,0g
Ágar-ágar	14,0g

#### Preparo

Dissolver 22,5g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deste meio deve ser de  $7,0 \pm 0,2$ .

## 5. Ágar Três Açúcares e Ferro (TSI)

### Composição (g/L)

Peptona de caseína	15,0g
Peptona de carne	5,0g
Extrato de carne	3,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Lactose	10,0g
Sacarose	10,0g
Dextrose	1,0g
Sulfato ferroso	0,2g
Tiosulfato de sódio	0,5g
Vermelho de fenol	0,024g
Ágar-ágar	12,0g

### Preparo

Dissolver 65g do meio em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio (5,0mL/tubo) e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. Retirar da autoclave e inclinar os tubos até esfriar e solidificar o meio. O pH final deste meio deve ser  $7,4 \pm 0,2$ .

## 6. Ágar Verde Brilhante (BG)

### Composição (g/L)

Proteose peptona	10,0g
Extrato de levedura	3,0g
Lactose	10,0g
Sacarose	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Verde brilhante	0,0125g
Vermelho de fenol	0,08g
Ágar-ágar	20,0g

### Preparo

Dissolver 58g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deste meio deve ser de  $6,9 \pm 0,2$ .

## 7. Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRB)

### Composição (g/L)

Peptona de carne	7,0g
Extrato de levedura	3,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Lactose	10,0g
Vermelho neutro	0,03g
Sais biliares	1,5g
Cristal violeta	0,002g
Ágar-ágar	13,0g

### Preparo

Dissolver 39,5g do meio em 1L de água destilada, aquecer até a completa dissolução do meio e distribuir imediatamente em placas de Petri estéreis.

Não autoclavar. O pH final deste meio deve ser de  $7,4 \pm 0,2$ .

## 8. Água Peptonada 0,1%

### Composição (g/L)

Peptona de carne ou de caseína	1,0g
--------------------------------	------

### Preparo

Dissolver 1g de peptona em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15min. O pH final deste diluente deve ser de  $7,0 \pm 0,2$ .

## 9. Água Peptonada Tamponada 1,0%

### Composição (g/L)

Peptona	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	3,5g
Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5g

### Preparo

Dissolver 10g em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15min. O pH final deste diluente deve ser de  $7,2 \pm 0,2$ .



## 10. Caldo Citrato

### Composição (g/L)

Fosfato de sódio amoniacal ( $\text{NaNH}_3\text{PO}_4$ )	1,5g
Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,0g
Sulfato de magnésio	0,2g
Citrato de sódio	3,0g

### Preparo

Dissolver os ingredientes em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio (3-4mL/tubo) e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. O pH final deste meio deve ser  $6,7 \pm 0,2$ .

## 11. Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI)

### Composição (g/L)

Infusão de cérebro	200,0g
Infusão de coração	250,0g
Proteose peptona	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2,5g
Dextrose	2,0g

### Preparo

Dissolver 37g do meio em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. O pH final deste meio deve ser  $7,4 \pm 0,2$ .

## 12. Caldo Rappaport Vassiliadis

### Composição (g/L)

Triptona	4,5g
Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	29,0g
Cloreto de sódio	8,0g
Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,6g
Fosfato dopotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,4g
Verde malaquita	0,036g

### Preparo

Dissolver 43g do meio em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. O pH final deste meio deve ser  $5,2 \pm 0,2$ .

### 13. Reagente de Kovacs para Prova de Indol (solução alcoólica 5% p- Dimetilaminobenzaldeído)

#### Composição

p- Dimetilaminobenzaldeído	5,0g
Álcool amílico	75,0mL
Ácido clorídrico concentrado	25,0mL

#### Preparo

Dissolver completamente o p- dimetilaminobenzaldeído no álcool amílico, aquecendo em banho-maria (50-60°C). Adicionar cuidadosamente o ácido clorídrico concentrado. Colocar em um frasco escuro e estocar em refrigerador por até 1 semana. O pH deste reagente deve ser inferior a 6,0.

### 14. Reagentes para prova de Vermelho de metila/Voges Proskauer (VM/VP)

#### Caldo VM/VP

#### Composição (g/L)

Peptona	7,0g
Glicose	5,0g
Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ )	5,0g

#### Preparo

Dissolver os reagentes em 1L de água destilada, distribuir em tubos (5mL/tubo) e esterilizar em autoclave a 121°C por 15min. O pH final deste meio deve ser  $6,9 \pm 0,2$ .

### Solução de Vermelho de metila

#### Composição (g/L)

Vermelho de metila	0,2g
Etanol 95%	600,0mL
Água destilada	400,0mL

#### Preparo

Dissolver o vermelho de metila em etanol 95% e completar o volume com água destilada. Armazenar sob refrigeração por até 3 semanas.

## 15. Soluções para Coloração de Gram

### Cristal Violeta

#### Composição

Cristal violeta	0,4g
Etanol 95%	10,0mL
Fenol	1,0g
Água destilada	100,0mL

#### Preparo

Diluir o cristal violeta em etanol 95% e adicionar o fenol dissolvido em água destilada. Manter em repouso por 24h e filtrar.

### Fucsina

#### Composição

Fucsina básica	0,3g
Etanol 95%	10,0mL
Fenol	5,0g
Água destilada	95,0mL

#### Preparo

Diluir a fucsina em etanol 95% e adicionar o fenol dissolvido em água destilada. Diluir a solução em 1/10.

**Lugol****Composição**

Iodo	5,0g
Iodeto de potássio	10,0g

**Preparo**

Misturar os dois reagentes e adicionar 100mL de água destilada. Diluir 1/15.

**Álcool-Acetona****Composição**

Acetona	50,0mL
Etanol 95%	50,0mL

**Preparo**

Misturar os dois reagentes.

**16. Solução de Plasma de Coelho para Prova de Coagulase****Composição**

Plasma de coelho liofilizado com EDTA	3,0g
Solução salina 0,85%	3,0mL

**Preparo**

Dissolver o plasma liofilizado em solução salina 0,85% e utilizar em seguida.

**17. Soluções para Extração de Ácidos Graxos****Solução de metanol/ NaOH****Composição**

Hidróxido de sódio (NaOH)	45,0g
Metanol	150,0mL
Água destilada	150,0mL

**Preparo**

Dissolver o NaOH em metanol e adicionar a água destilada.

**Solução de HCl/ Metanol**Composição

HCl 6N	325,0mL
Metanol	275,0mL

## Preparo

Misturar os dois reagentes.

**Solução de Hexano/ Éter metil *tert*-butil**Composição

Hexano	200,0mL
Éter metil <i>tert</i> -butil	200,0mL

## Preparo

Misturar os dois reagentes.

**Solução de Hidróxido de sódio 0,3M**Composição

Hidróxido de sódio (NaOH)	10,8g
Água destilada	900,0mL

## Preparo

Dissolver o NaOH em água destilada.

**18. Solução Salina 0,85%**Composição

Cloreto de sódio (NaCl)	8,5g
Água destilada	1000,0mL

## Preparo

Dissolver o NaCl em água destilada, esterilizar em autoclave a 121°C por 15min.

