



ESTUDO DA PRESENÇA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM VEGETAIS PELA
TÉCNICA NEUTRONGRÁFICA

Tiago Fausto França da Costa e Sá

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Nuclear.

Orientadores: Verginia Reis Crispim
Rafael Silva Duarte

Rio de Janeiro
Agosto de 2013

ESTUDO DA PRESENÇA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM VEGETAIS PELA
TÉCNICA NEUTRONGRÁFICA

Tiago Fausto França da Costa e Sá

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof^a. Verginia Reis Crispim, D.Sc

Prof. Rafael Silva Duarte, D.Sc

Dr. Luis Eduardo Barreira Brandão, D.Sc

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc

Dr^a. Ana Cristina de Holanda Nascimento, D.Sc

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

AGOSTO DE 2013

Sá, Tiago Fausto França da Costa e

Estudo da presença de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais pela técnica neutrongráfica / Tiago Fausto França da Costa e Sá – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XII, 52 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Verginia Reis Crispim

Rafael Silva Duarte

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 48-52.

1. Física Nuclear 2. Neutronografia 3. *E. coli* I.
Crispim, Verginia Reis *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III.
Título.

AGRADECIMENTOS

À professora Verginia Reis Crispim, pela oportunidade de trabalho e pela sua orientação, apoio e paciência durante todas as etapas da pesquisa.

Ao professor Rafael Duarte da Silva, pela orientação, parceria e disponibilização do seu laboratório para pesquisa.

Ao técnico Marlei Gomes da Silva, pelas ideias, disponibilidade e ajuda imprescindível na realização dos ensaios.

Aos técnicos do IEN/CNEN, pela disponibilidade e ajuda nas irradiações.

A Jaqueline Silva, pela sua ajuda na preparação das amostras e visualização das imagens, essencial ao trabalho.

Ao Programa de Engenharia Nuclear da COPPE, por possibilitar a realização deste trabalho.

À minha família, por todo o suporte que sempre me deu.

Aos meus amigos, pela descontração nos momentos de tensão.

À minha namorada Camila de Souza Ferreira, que tanto me estimulou, ajudou e aturou durante todo o mestrado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ESTUDO DA PRESENÇA DE *Escherichia coli* O157:H7 EM VEGETAIS
PELA TÉCNICA NEUTRONGRÁFICA

Tiago Fausto França da Costa e Sá

Agosto/2013

Orientadores: Verginia Reis Crispim
Rafael Silva Duarte

Programa: Engenharia Nuclear

A *Escherichia coli* é uma bactéria comum que vive em mutualismo nos intestinos de seres humanos e outros mamíferos. Contudo, algumas cepas, como a *E.coli* O157:H7, são responsáveis pelo risco de morte por contaminação alimentar. Este estudo objetivou testar a viabilidade de se empregar a Neutronografia como mecanismo de verificação da ocorrência de bactérias bacilares em vegetais. Escolheram-se os vegetais: batata, pepino e alface, que foram contaminados em diferentes níveis, de forma controlada, além de alface e pepino *in natura*. A Neutronografia se mostrou uma técnica vantajosa frente às tradicionais, no que se refere ao tempo de análise, na proporção de cerca de 3 horas para 24 horas (mínimo), respectivamente, já que ela não exige o cultivo da colônia de bactérias, em meio adequado de cultura. Concluiu-se que a Neutronografia apresenta aplicabilidade limitada na determinação de contaminação alimentar em vegetais, em função da impossibilidade de diferenciar os tipos de bactérias bacilares.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

STUDY OF THE PRESENCE OF *Escherichia coli* O157: H7 IN VEGETABLES
BY THE NEUTRON RADIOGRAPHY TECHNIQUE

Tiago Fausto França da Costa e Sá

August/2013

Advisors: Verginia Reis Crispim

Rafael Silva Duarte

Department: Nuclear Engineering

Escherichia coli is a common bacteria that lives in mutualistic relationship in the intestine of human beings and other mammals. However, some strains such as *E.coli* O157:H7, can cause the death through food contamination. This study aims at determining the possibility of detecting the presence of these bacteria in vegetables by Neutron Radiography. The vegetables chosen were: potato, cucumber and lettuce submitted to different levels of contamination, in a controlled way, besides *in natura* lettuce and cucumber. Neutron Radiography proved to have advantages in relation to analysis time, taking around 3 hours when compared to 24 hours minimum of traditional techniques, because it does not demand culture in adequate media. It was concluded that the Neutron Radiography has limited applicability in the determination of food contamination in plants, due to the impossibility to differentiate of types of bacteria bacilli.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
I.1 – Generalidades	1
I.2 – Objetivo	3
I.3 – Revisão bibliográfica	3
CAPÍTULO II – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
II.1 – Caracterização morfológica das bactérias	7
II.1.1 – <i>Escherichia coli</i> O157:H7	9
II.2 – Contaminação alimentar	11
II.2.1 – Breve histórico de surtos de contaminação alimentar por <i>E. coli</i> O157:H7	13
II.2.2 – Protocolos utilizados na verificação de contaminação alimentar por <i>E. coli</i> O157:H7	14
II.3 – A técnica neutrongráfica	15
II.3.1 – Interação dos nêutrons com a matéria	17
II.3.2 – As fontes de nêutrons	18
II.3.3 – A colimação do feixe neutrônico	20
II.3.4 – A Neutronografia com CR-39	23
CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS	28
III.1 – Preparo do material e das amostras biológicas	28
III.2 – Ensaio neutrongráficos	29
III.2.1 – Ensaio com crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 em batata	29
III.2.2 – Ensaio com inoculação controlada de <i>E. coli</i> O157:H7 em batata	30
III.2.3 – Ensaio com crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 em alface e pepino	31

III.2.4 – Ensaio com inoculação controlada de <i>E. coli</i> O157:H7 em alface e pepino	32
III.2.5 – Ensaio com alface e pepino <i>in natura</i>	33
III.3 – Preparo das amostras para análise neutrongráfica	33
III.3.1 – Irradiação das amostras	33
III.3.2 – Revelação de traços nucleares	34
III.3.3 – Captura de imagens	35
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
IV.1 – Ensaio com crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 em batata	37
IV.2 – Ensaio com inoculação controlada de <i>E. coli</i> O157:H7 em batata	39
IV.3 – Ensaio com crescimento de <i>E. coli</i> O157:H7 em alface e pepino	41
IV.4 – Ensaio com inoculação controlada de <i>E. coli</i> O157:H7 em alface e pepino	43
IV.5 – Ensaio com pepino e alface <i>in natura</i>	44
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1 – Morfologia das bactérias (BROOKS <i>et al</i> , 1998).	7
Figura II.2 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura da <i>E. coli</i> .	10
Figura II.3 – Configuração do sistema montado para a realização de uma Neutronografia.	16
Figura II.4 – Colimador divergente.	21
Figura II.5 – Efeito de penumbra devido à divergência do feixe.	22
Figura II.6 – Placa de CR-39 não irradiada (virgem).	23
Figura II.7 – Esquema da formação das imagens no CR-39.	25
Figura II.8 – Representação de um traço nuclear registrado pela penetração de uma partícula alfa em SSNTD (FLEISCHER, 1975).	25
Figura II.9 – Representação esquemática, segundo uma visão lateral, da formação de um traço revelado de uma partícula alfa num SSNTD (FLEISCHER, 1975).	26
Figura II.10 – Representação esquemática de alguns ângulos de incidência de uma partícula alfa num SSNTD.	27
Figura III.1 – Diagrama representativo do método das diluições decimais.	31
Figura III.2 – Esquema de montagem experimental do conjunto amostra-detector junto ao feixe de nêutrons.	33

Figura III.3 – Esquema da coluna térmica externa situada na parte frontal do reator Argonauta (FERREIRA, 2003).	34
Figura IV.1 – Imagem da régua microscópica com precisão de 1µm, ampliada 400x.	36
Figura IV.2 – (1) defeitos do CR-39. (2) traços de partículas alfa. (3) aglomerado de <i>E. coli</i> O157:H7.	37
Figura IV.3 – Ampliação da região onde se observou o aglomerado de bactérias, na figura IV.2.	38
Figura IV.4 – Imagem com bactérias isoladas.	39
Figura IV.5 – Imagens obtidas com a inoculação de <i>E. coli</i> O157:H7 em batata esterilizada.	40
Figura IV.6 – Imagem do grupo controle, sem a presença de bacilos.	41
Figura IV.7 – Cadeias de <i>E. coli</i> O157:H7, após crescimento por 24 horas, em alface.	42
Figura IV.8 – Bactérias, após crescimento por 24 horas, em pepino.	42
Figura IV.9 – Bactérias isoladas em alface inoculado.	43
Figura IV.10 – Bactérias isoladas em pepino inoculado.	43
Figura IV.11 – Imagens neutronográficas de bacilos, caracterizados morfológica-mente, presentes em amostra de alface <i>in natura</i> .	44
Figura IV.12 – Imagens neutronográficas das amostras de pepino <i>in natura</i> .	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela II.1 – Principais agentes biológicos em contaminação alimentar (ACHESON, 1999).	12
Tabela II.2 – Classificação dos nêutrons pela energia (LAMARSH, 1978).	18
Tabela II.3 – Fontes emissoras de nêutrons (DOMANUS, 1992).	19
Tabela II.4 – Características das fontes isotrópicas (DOMANUS, 1992).	20

LISTA DE SIGLAS

- BHI – *Brain Heart Infusion* (infusão de cérebro e coração).
- CCD – *Charged-Coupled Device* (dispositivo de carga coplada).
- CDC – *Center for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças).
- CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear.
- COPPE – Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia.
- CR-39 – *Columbia Resin* nº39 (detector de traços nucleares).
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EHEC – *Enterohemorrhagic E. coli* (*E. coli* enterohemorrágica).
- END – Ensaio Não-Destrutivo.
- EPEC – *Enteropathogenic E. coli* (*E. coli* enteropatogênica).
- EUA – Estados Unidos da América.
- eV – elétron-Volt
- HUS – *Hemolytic-Uremic Syndrome* (síndrome urêmica hemolítica)
- IEN – Instituto de Engenharia Nuclear.
- LNRTR – Laboratório de Neutronografia em Tempo Real.
- NIAID – *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas).
- NIH – *National Institutes of Health* (Institutos Nacionais de Saúde)
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase).
- PEN – Programa de Engenharia Nuclear.
- RNA – *Ribonucleic Acid* (ácido ribonucleico).
- SSNTD – *Solid-State Nuclear Track Detector* (detector de traços nucleares em estado sólido).
- UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1 – Generalidades

As bactérias estão muito presentes em nosso cotidiano – são responsáveis pela fermentação do iogurte, pão e cerveja, compõem nossa microbiota intestinal, ajudam a digerir alimentos e produzem vitaminas. Contudo, às vezes elas também nos trazem malefícios – os mais evidentes são as infecções e doenças.

Em 1885, o médico alemão Theodor Escherich descobriu um novo tipo de bactéria nas fezes de indivíduos saudáveis. Inicialmente, a bactéria foi nomeada como *Bacterium coli commune*, pelo fato de ser encontrada comumente no cólon; em 1895, ela foi reclassificada como *Bacillus coli* – por ter a forma de bacilo; posteriormente, foi renomeada como *Escherichia coli*, em homenagem ao seu descobridor.

Embora a *E. coli* viva em mutualismo nos intestinos de seres humanos e outros mamíferos, algumas cepas são responsáveis pela contaminação alimentar em humanos. Mais especificamente, a *E. coli* O157:H7 foi identificada como agente patógeno de um surto de contaminação gastrointestinal pela primeira vez, em 1982, nos EUA e Japão. Desde então, ela tem sido relacionada a diversos casos isolados e surtos de contaminação alimentar pelo mundo.

Nas últimas décadas, a alimentação tem sido motivo de preocupação em todos os países. Um grande desafio é adequar a produção de alimentos à demanda crescente da população mundial, já que existem milhões de indivíduos famintos nos países subdesenvolvidos. Com a globalização, ficaram mais evidentes os problemas relativos à qualidade dos alimentos para consumo humano. A Organização Mundial da Saúde (WHO, sigla em inglês de *World Health Organization*) tem alertado para a necessidade de se coibir a contaminação de alimentos por agentes biológicos com potencial de causar danos à saúde. Há vários motivos que explicam a persistência ou até o aumento da contaminação dos alimentos. Os criadores usam antimicrobianos para auxiliar na engorda de aves e suínos, para consumo humano. Essa conduta, embora vantajosa do ponto de vista econômico, tem sido responsável pela emergência de cepas resistentes de

bactérias patogênicas, como é o caso de *Campylobacter jejuni* e *Salmonella typhimurium*, resistentes a quinolonas.

Recentemente, no ano de 2011, ocorreu um grande surto de contaminação alimentar por *E. coli* na Europa. Segundo a WHO, nesse surto, ocorreram mais de 30 mortes, além de um grande impacto econômico, pois colheitas inteiras foram destruídas, para se evitar o consumo, e importações de determinados alimentos foram suspensas. O caso mais marcante foi o embargo pela Alemanha aos vegetais vindos da Espanha, em especial o pepino. Posteriormente provou-se que os vegetais espanhóis não eram os causadores do surto, o que gerou tensão política entre os dois países. Inicialmente, acreditou-se que esse surto tivesse sido causado pela *E. coli* O157:H7, uma cepa enterohemorrágica da bactéria, mas há indícios de que esse surto tenha sido causado por uma nova cepa da *E. coli*, uma mutação mais resistente da bactéria comum. Essa nova cepa foi nomeada de *E coli* O104:H4.

Em maior visibilidade nos últimos anos, a *E. coli* O157:H7 é um importante patógeno causador de doenças de transmissão alimentar. Mesmo com incidência consideravelmente menor que as demais cepas de *E. coli*, ela apresenta sério risco à saúde, sendo fatal em alguns casos, em especial, em idosos e crianças, por terem o sistema imunológico mais frágil.

Desde sua identificação em 1982, a *E. coli* O157:H7 tem sido apontada como agente patológico de diversos surtos envolvendo colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (KUNTZ *et al*, 1999). Nos EUA, de acordo com o CDC, os alimentos que, com maior frequência, estão relacionados a surtos de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), no período de 1993 a 1997, foram, em primeiro lugar, a carne bovina e, em segundo, as frutas, saladas e vegetais crus.

Os Ensaio Não-Destrutivos (END) são técnicas de inspeção de materiais que não danificam ou alteram as características físicas dos mesmos. Existem diversas técnicas de END, tais como: as radiográficas (radiografia com raios-X, Neutronografia e Gamagrafia), Ultrassonografia e a que emprega líquidos penetrantes. Os END são amplamente utilizados, tanto na área industrial, quanto na área de pesquisa. Atualmente, é comum a utilização dos END na indústria petroquímica, na construção civil, na aeronáutica e na medicina, dentre outros (CARTZ, 1995).

A Radiografia-X é uma técnica de inspeção não destrutiva que se baseia na absorção diferenciada da radiação penetrante pelas diferentes partes do objeto inspecionado. Devido à variação de densidade e espessura do material, ou mesmo de

diferentes probabilidades de absorção, em função da composição do material, cada região do objeto inspecionado poderá absorver quantidades diversas de radiação-X. Essa absorção diferenciada da radiação poderá ser registrada num filme radiográfico, num tubo de imagem ou, até mesmo, por sistemas eletrônicos de imagem. Essa variação na quantidade de radiação absorvida pelo meio poderá indicar, por exemplo, a existência de uma falha interna ou defeito no objeto inspecionado.

Especificamente, os nêutrons, por não apresentarem cargas elétricas e não sofrerem ação das forças coulombianas, interagem diretamente com os núcleos dos átomos. A atenuação dos nêutrons depende de sua energia e das características dos núcleos que constituem o material do objeto inspecionado. Uma das vantagens da utilização da radiografia com nêutrons (Neutronografia) reside no fato de se poder inspecionar materiais leves ocultos por outro pesado, principalmente, no caso da forte atenuação dos nêutrons por núcleos de hidrogênio.

I.2 – Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo testar a viabilidade de se empregar a Neutronografia como mecanismo de verificação da ocorrência de bactérias bacilares em vegetais consumidos crus ou semi-cozidos. O estudo teve como motivação o surto de contaminações alimentares por *Escherichia coli* na Europa, que ocorreu em meados de 2011.

Objetiva-se verificar a presença de bactérias em alimentos, por Neutronografia, complementarmente às técnicas existentes, de forma a agilizar o processo de combate à contaminação alimentar.

I.3 – Revisão bibliográfica

Em 1932, o físico inglês James Chadwick descobriu o nêutron livre, uma partícula sem carga elétrica, inicialmente definido como um núcleon do núcleo atômico. Essa descoberta rendeu a ele o Prêmio Nobel de Física, em 1935.

Em 1935, os alemães H. Kallman e E. Kuhn obtiveram as primeiras imagens por radiografia com nêutrons. Para isso, utilizaram uma fonte de rádio-berílio (Ra-Be) e um pequeno acelerador. As imagens obtidas eram de má qualidade, em virtude da baixa intensidade e dispersão do feixe neutrônico. O grande tempo de exposição necessário,

associado à baixa qualidade das imagens, fez com que a técnica despertasse pouco interesse na comunidade científica.

Em 1956, na Inglaterra, Thewlis e Derbyshire utilizaram, pela primeira vez, um reator nuclear como fonte de nêutrons para obterem imagens neutrongráficas de qualidade superior às anteriores, com base numa maior intensidade e melhor colimação do feixe neutrônico. Essa melhora significativa apresentou ao mundo a viabilidade de emprego da técnica neutrongráfica.

Em 1958, David Young observou pequenas marcas superficiais num cristal de fluoreto de lítio (LiF), com um microscópio óptico. O cristal havia sido posto em contato com uma folha de urânio, irradiado com nêutrons térmicos e submetidos a um ataque químico. Essas marcas, chamadas de traços nucleares, foram deixadas pelos fragmentos da fissão do urânio, induzida por nêutrons térmicos. Dessa forma, Young descobriu os chamados Detectores de Traços Nucleares em Estado Sólido (SSNTD, sigla em inglês de *Solid-State Nuclear Track Detector*).

Em 1970, nos EUA e em países da Europa, grande parte dos institutos de pesquisa que dispunham de reatores nucleares possuía projetos que empregavam a técnica neutrongráfica.

Em 1973, na Inglaterra, e em 1975, nos Estados Unidos, foram realizadas as primeiras padronizações relativas à neutrongrafia.

Em 1975, Tyufyakov e Shtan publicaram o livro *Principles of Neutron Radiography*.

Em 1978, identificou-se a aplicabilidade do CR-39 como SSNTD (Detector de traços nucleares em estado sólido), sendo o mais utilizado atualmente. O CR-39 é um polímero e foi descoberto na década de 1930, mas, até então, era utilizado somente na fabricação de lentes. Em 1978, Cartwright, Shirk e Price descobriram sua capacidade de detectar partículas ionizadas através traços nucleares deixados no plástico.

Em 1979, ocorreu a criação do *Neutron Radiography Working Group*, apoiado pela *Commission of the European Communities*. A criação desse grupo possibilitou grande avanço nas inspeções de objetos através da Neutronografia. Em 1981, o grupo publicou o manual *Neutron Radiography Handbook*. Em 1984, publicou um atlas sobre a detecção dos defeitos dos elementos combustíveis de usinas nucleares.

Ainda em 1981, ocorreu a Primeira Conferência Mundial sobre Radiografia com Nêutrons, nos Estados Unidos, onde foram apresentados 124 trabalhos sobre o tema. Essa conferência contou com pesquisadores dos Estados Unidos, Canadá e Europa. As

edições seguintes aconteceram em: 1986, na França; 1989, no Japão; 1992, nos EUA; 1996, na Alemanha; 2001, no Japão; 2002, na Itália; 2006, nos EUA; 2010, na África do Sul.

Em 1987, J. C. Domanus publicou o livro *Collimators for Thermal Neutron Radiography*. Em 1992, o mesmo autor publicou o livro *Practical Neutron Radiography*, uma compilação de trabalhos publicados por diversos autores nas Conferências Mundiais sobre Radiografia com Nêutrons.

No que diz respeito aos estudos na área realizados no Brasil, em 1993, V. R. Crispim defendeu sua tese de doutorado, no PEN/COPPE/UFRJ, sobre o título “Desenvolvimento de Ensaio Não-Destrutivo com Neutronografias”, onde se concentrou na instalação de um sistema tomográfico, no canal J-9 do reator Argonauta, localizado no IEN/CNEN, com o objetivo de detectar e localizar corrosões ocultas em ligas de alumínio AA7075.

Em 1999, R. Wacha defendeu sua dissertação de mestrado, no PEN/COPPE/UFRJ, sobre o título “Detecção de micro-organismos em meio de cultura pela técnica neutronográfica”, onde verificou a eficiência da técnica neutronográfica, utilizando o CR-39, para caracterizar morfológicamente micro-organismos.

Em 2001, J. D. R. Lopes defendeu sua tese de doutorado, no PEN/COPPE/UFRJ, sobre o título “Caracterização morfológica e análise quantitativa de bactérias *in vitro* por técnicas nucleares de medidas”, onde utilizou a Neutronografia para obter imagens de bactérias e caracterizar suas estruturas.

Em 2004, R. Wacha defendeu sua tese de doutorado, no PEN/COPPE/UFRJ, sobre o título “Detecção de Partículas Virais Através da Técnica Neutronográfica”, onde aprofundou a técnica por ele utilizada em sua pesquisa de mestrado.

Em 2008, A. G. Paula defendeu sua dissertação de mestrado, no PEN/COPPE/UFRJ, sobre o título “Levantamento de protocolos para a investigação de contaminação da água, utilizando a caracterização morfológica de bactérias por Neutronografia”, onde buscou desenvolver um protocolo, fazendo uso da técnica neutronográfica, para verificar a presença de bactérias em ambientes aquáticos em menor tempo, comparativamente às técnicas tradicionais.

Em 2009, C. T. S. Lima defendeu sua tese de doutorado, no PEN/COPPE/UFRJ, sobre o título “Ensaio Neutronográfico para Estudo Morfológico de Micobactérias”, onde buscou obter imagens neutronográficas de micobactérias, em particular, a

Mycobacterium tuberculosis, agente causadora da tuberculose, e caracterizá-la morfológicamente.

Em 2013, J. M. I. Silva defendeu sua tese de doutorado, no PEN/COPPE/UFRJ, sobre o título “Caracterização Morfológica de Micobactérias Não Tuberculosas Ambientais por Ensaio Neutronográfico”, onde buscou agilizar o diagnóstico de doenças causadas por micobactérias, através da técnica neutronográfica.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

II.1 – Caracterização morfológica das bactérias

Bactérias são organismos unicelulares que podem ser encontrados nos mais variados ambientes. As bactérias são células procariotas, ou seja, apresentam material celular sem membrana nuclear, apresentam diversas formas e, embora sejam unicelulares, muitas vezes aparecem agrupadas. Apresentam grande importância em aplicações na indústria e na produção de antibióticos, e também podem ser responsáveis por uma série de infecções (MADIGAN *et al*, 2011, BROOKS *et al*, 1998).

A morfologia característica de cada bactéria é mantida pela estrutura rígida da parede celular, e seu tamanho é da ordem de micrometros. A figura a seguir ilustra alguns dos principais tipos de estrutura e formas de agrupamento das bactérias.

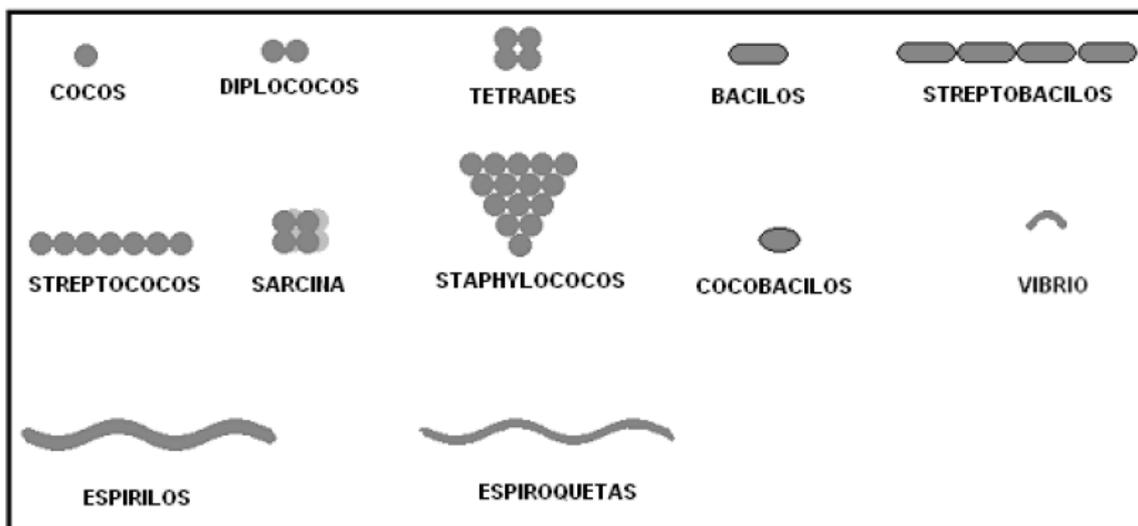


Figura II.1: Morfologia das bactérias (BROOKS *et al*, 1998).

Os cocos apresentam forma esférica ou subsférica, com diâmetro entre 0,5µm e 1,0µm, mas por vezes também apresentam formas elípticas e de “chama de vela”, recebendo um nome de acordo com seu agrupamento: quando dois cocos se agrupam formam *diplococos*; se formarem cadeias num plano, com 4 a 20 células, são chamados *streptococos*. Se as células se dividirem em mais de um plano ou dimensão, a

disposição é mais complexa: quando os *cocos* se dividem em um ângulo reto, formam a *tétrades* ou *tetracocos*; se a divisão é realizada regularmente ao longo das três dimensões, são chamadas de *sarcina*; quando a divisão ao longo das três dimensões é realizada de forma irregular, formando “cachos de uva”, são denominados *staphylococos*.

Os bacilos possuem forma de bastonete, com dimensões que variam de 0,5µm a 1,0µm de diâmetro, e 1,0µm a 4,0µm de comprimento. Normalmente os bacilos não se agrupam em disposições características, mas há exceções; quando em pares, são denominados *diplobacilos*; quando em cadeias, são denominados *streptobacilos*. Um exemplo é o bacilo da difteria, que tende a produzir grupos de células alinhadas lado a lado em um arranjo de paliçada (BROOKS *et al*, 1998).

Os espirilos são encontrados em dois formatos: as *espiroquetas*, que possuem forma de saca-rolha; e os *vibriões*, que possuem forma de “vírgula”. Os espirilos apresentam dimensões que variam de 0,25µm a 0,5µm de diâmetro, e 1,0µm até 100µm de comprimento. Um exemplo de espirilo muito conhecido é o vibrião colérico, responsável pela cólera, doença muito comum em locais onde não há tratamento adequado da água consumida pelos humanos (BROOKS *et al*, 1998).

As células bacterianas não possuem membrana nuclear nem nucléolo. A estrutura geral de uma bactéria é, essencialmente, composta por flagelos, glicocálice, parede celular e membrana plasmática. Os flagelos são filamentos finos e ocos usados para locomoção ou para adesão em superfícies, e não estão presentes em todas as bactérias. O glicocálice é um material viscoso que circunda algumas células bacterianas, tendo diversas funções, como aderência, proteção contra dessecação, anti-adsorção e anti-lise das células por bacteriófagos. A parede celular é constituída, principalmente, por camadas de diferentes substâncias que variam de acordo com o tipo de bactéria envolvida, variando de espessura e composição. A membrana citoplasmática se localiza logo abaixo da parede celular e é o local de atividade de enzimas específicas e de transporte de moléculas para dentro e fora da célula (MADIGAN *et al*, 2011).

O material delimitado pela membrana citoplasmática pode ser dividido na região citoplasmática e na região nuclear. A região citoplasmática consiste na porção fluida da célula, sendo formada por cerca de 80% de água, e nela estão dissolvidas diversas substâncias e partículas. A região nuclear, que não possui uma membrana limitando suas dimensões, está localizada nas proximidades do centro da célula e é formada por todo material nuclear da célula (que é chamado de nucleóide). Esse material nuclear

consiste de cromossomos, que são os responsáveis pela transmissão da informação hereditária das células. As bactérias podem possuir um ou dois cromossomos circulares, ou cromossomo linear (MADIGAN *et al*, 2011).

A parede celular é responsável por um grande percentual do peso seco da célula. Dependendo da espécie e das condições de crescimento, esse percentual pode chegar a 40% do peso seco total. Com relação à composição química, as paredes celulares não possuem estruturas homogêneas, contendo diversas substâncias que variam de acordo com o tipo de bactéria. Essa diversidade ajuda a explicar as diferentes reações das bactérias à técnica de coloração de Gram, que as classifica segundo a relativa resistência ao descoloramento pelo álcool (MADIGAN *et al*, 2011; BROOKS *et al*, 1998).

A técnica de coloração de Gram separa as bactérias em dois grandes grupos, as Gram-positivas e a Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas possuem parede celular com espessura entre 20nm e 25nm, com uma camada peptidoglicana que pode representar metade do peso seco da parede celular, além de ácidos teicóicos – que são polímeros de glicerol e ribitol fosfato, que, carregados negativamente, podem ajudar no transporte de íons positivos. As bactérias Gram-negativas possuem parede celular menos espessa, porém mais complexa. Elas possuem uma camada externa bem fina, chamada de lipopolissacarídica, que cobre a camada peptidoglicana (que pode representar entre 5% e 10% do peso seco da parede celular). Por ser pouco espessa, a membrana celular funciona como um tipo de “peneira molecular”, pois na camada externa existem canais de difusão formados por proteínas especiais, chamadas porinas, que permitem a passagem das moléculas (MADIGAN *et al*, 2011).

II.1.1 – *Escherichia coli* O157:H7

A *Escherichia coli* é uma bactéria em forma de bastonete, com cerca de 0,5 µm de diâmetro de base por 2,0 µm de comprimento. É uma bactéria Gram-negativa comumente presente no intestino dos animais, inclusive do homem, e exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Contudo, dentre as diversas cepas de *E. coli*, existe um grupo capaz de provocar doenças em seres humanos, que são coletivamente chamadas de *E. coli* patogênicas. Existem 6 grupos conhecidos de *E. coli* capazes de gerar gastroenterites em humanos: as enteropatogênicas, as enterotoxigênicas,

as enteroinvasivas, as enterohemorrágicas, as enteroagregativas e as difuso-aderentes. (MADIGAN *et al*, 2011).

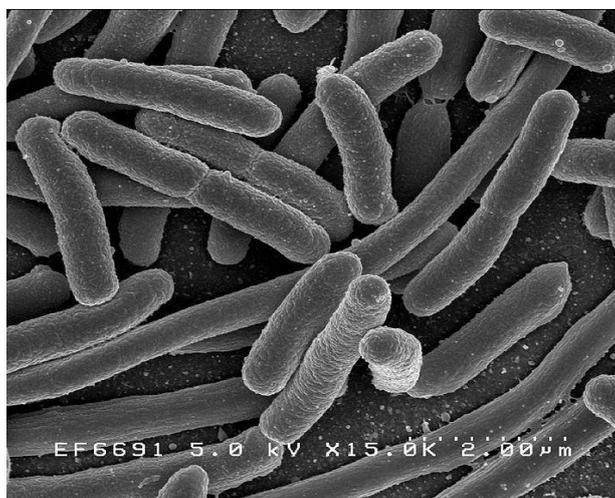


Figura II.2: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura da *E. coli*.*

No ano de 2000, as cepas enterohemorrágicas de *E. coli* (EHEC) ocupavam o segundo lugar entre os principais agentes de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos, onde responderam por 7,4% dos surtos e 28,6% das mortes provocadas por bactérias no período entre 1993 e 1997 (OLSEN *et al*, 2000).

Dentre as diversas classes de *E. coli* reconhecidas, está a cepa de *E. coli* O157:H7, que pertence ao grupo de EHEC ou produtora de verotoxina. A combinação de letras e números utilizada na classificação da bactéria se refere aos marcadores específicos encontrados em sua superfície: O157 é referente ao antígeno somático e H7 é referente ao antígeno flagelar. Acredita-se que a patogenicidade das cepas enterohemorrágicas de *E. coli* esteja ligada à produção de diversas citotoxinas, coletivamente chamadas de verotoxinas ou “shiga-like” toxinas, similares à toxina produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I. As verotoxinas provocam uma doença chamada de “colite hemorrágica” que, em casos mais extremos, resulta em um quadro conhecido como “síndrome urêmica hemolítica” (HUS, do inglês *Hemolytic-Uremic Syndrome*). A HUS tem um período de incubação de 3 a 10 dias e duração de 2 a 9 dias. Os sintomas são diarreia sanguinolenta e dores abdominais intensas. Cerca de

* Crédito da imagem: Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH. Disponível em http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/biodefenserelated/e_coli.jpg

10 a 15% dos casos de colite hemorrágica se agravam até o quadro de HUS, situação em que ocorre destruição de eritrócitos e falha aguda dos rins, levando à necessidade de diálise, transplante dos rins ou até morte. (WEAGANT *et al*, 1995).

O grupo das EHEC tem mais de 60 sorotipos que produzem shiga-like toxinas, mas o sorotipo O157:H7 predomina, sendo o mais frequentemente associado a surtos de colite hemorrágica e HUS (KARMALI, 1989). As principais características que distinguem a *E. coli* O157:H7 das demais cepas de *E. coli* são o crescimento pobre ou nulo a 44°C e a incapacidade de utilizar o sorbitol e produzir a enzima β -glucuronidase. Em função dessas características, a cepa de *E. coli* O157:H7 não é detectável na análise de coliformes fecais pelo método do número mais provável, pois o mesmo utiliza a fermentação da lactose a 44,5°C como características confirmativa, nem através das análises diretas de *E. coli* utilizando substratos para a enzima β -glucuronidase (MENG *et al*, 1994).

II.2 – Contaminação alimentar

A contaminação de seres humanos, através do consumo de água e alimentos contaminados, é uma preocupação constante em todo o mundo. Muitos micro-organismos presentes em alguns alimentos acarretam intoxicações alimentares, mesmo que esses alimentos não apresentem alterações de cheiro, aspecto ou sabor. Os principais agentes biológicos responsáveis pela contaminação da água e alimentos e na causa de doenças ao homem são vírus, protozoários, vermes, fungos, bactérias e toxinas microbianas (FRANCO, 2003).

As bactérias são os micro-organismos com maior ocorrência em contaminações alimentares. Entre elas, algumas muito comuns são a *Salmonella sp*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter sp* e *Escherichia coli*, sendo as duas últimas as principais causadoras de diarreia em seres humanos. O botulismo, por exemplo, é causado pela toxina produzida por uma bactéria do gênero *Clostridium*, que afeta o sistema nervoso e pode levar à morte (ACHESON, 1999). A tabela a seguir ilustra os principais agentes biológicos responsáveis pela contaminação de alimentos.

Tabela II.1: Principais agentes biológicos em contaminação alimentar (ACHESON, 1999).

Agentes biológicos	
<p>Bactérias</p> <p>Produtoras de toxinas pré-formadas <i>Clostridium botulinum</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i></p> <p>Produtoras de toxinas na luz intestinal <i>Vibrio spp</i> <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga <i>E. coli</i> enterotoxigênica</p> <p>Invasoras do epitélio intestinal <i>Salmonella spp</i> <i>Campylobacter spp</i> <i>Yersinia spp</i> <i>Shigella spp</i> <i>E. coli</i> enteroinvasiva <i>Listeria monocytogenes</i></p> <p>Outras <i>Aeromonas spp</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>E. coli</i> enteropatogênica</p> <p>Fungos <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i></p>	<p>Vírus</p> <p>Vírus da hepatite A Vírus da hepatite B Rotavírus Adenovírus (entérico) Parvovírus</p> <p>Protozoários <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Isospora belli</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Blastocystis hominis</i></p> <p>Parasitas <i>Taenia solium</i> <i>Taenia saginata</i> <i>Hymenolepis nana</i> <i>Ascaris</i> <i>Trichuris</i> <i>Trichinella spiralis</i></p> <p>Toxinas Tetrodotoxina Micotoxinas Aflatoxinas</p>

Nas infecções em seres humanos causadas por *E. coli* O157:H7, após a ingestão da água ou alimento contaminado, a bactéria se aloja no intestino delgado, se multiplica e produz a verotoxina, que é responsável pela diarreia hemorrágica e falha do funcionamento dos rins (MADIGAN *et al*, 2011).

O transporte, processamento e distribuição dos alimentos são fundamentais para indústria de alimentos, mas também são as principais fontes de contaminação alimentar, quando não são executados adequadamente e seguindo as normas de segurança. Em escala domiciliar, a contaminação dos alimentos ocorre principalmente no preparo, armazenamento e manipulação dos alimentos (MADIGAN *et al*, 2011).

II.2.1 – Breve histórico de surtos de contaminação alimentar por *E. coli* O157:H7

A estimativa anual de infecção por *E. coli* O157:H7, nos EUA, é de 63.000 casos, com cerca de 50 casos levando a óbito. A infecção alimentar por *E. coli* O157:H7 é a principal causa da HUS e falha nos rins, com 292 casos reportados em 2007, nos EUA, sendo aproximadamente a metade em crianças abaixo dos 5 anos (MADIGAN *et al*, 2011).

A *E. coli* O157:H7 foi reconhecida como agente causador de doença pela primeira vez, em 1982, nos Estados Unidos e Japão, em um surto de diarreia sanguinolenta severa, tendo sido isolada em hambúrgueres contaminados (KUNTZ e KUNTZ, 1999).

Em 1991, ocorreu um surto em que 23 pessoas foram contaminadas ao consumir cidra de maçã sem pasteurização. Acredita-se que a cidra tenha sido feita a partir de maçãs colhidas do chão contaminadas com esterco bovino (FENG,1995).

Em 1993, houve um surto no Oregon, EUA, provocado pelo consumo de melão e salada em um restaurante. Acredita-se que tenha havido contaminação cruzada na manipulação dos alimentos na cozinha do restaurante (FENG, 1995).

Em 1995, em Montana, EUA, 92 pessoas foram contaminadas num surto provocado pelo consumo de alface irrigada com água contaminada.

Em 1996, há registro de dois casos similares de contaminação por consumo de suco de maçã não pasteurizado nos EUA e Canadá. O primeiro atingiu, no mínimo, 70 pessoas em diversos estados no lado oeste dos Estados Unidos, com 3 casos de HUS e 1 morte; o segundo atingiu cerca de 45 pessoas na Califórnia, Colorado e Washington (EUA) e Columbia Britânica (Canadá), com 12 casos de HUS e sem registros de morte (CDC, 1996; CDC,1997).

Em 1996, também foram registrados 4 surtos de contaminação alimentar em escolas primárias no Japão, envolvendo o consumo de saladas cruas. O maior desses surtos ocorreu na cidade de Sakai, com mais de 5.500 pessoas sendo atingidas após consumirem broto de rabanete, e com 3 casos de morte registrados. Os outros três surtos aconteceram em Gifu (379 pessoas atingidas), Obihiro (157 pessoas atingidas) e Morioka (47 pessoas atingidas).

Em 1997, ocorreram dois surtos provocados pelo consumo de broto de alfafa nos EUA, sem vítimas fatais: um em Michigan, com 60 pessoas atingidas e 2 casos de HUS; outro em Virgínia, com 48 pessoas atingidas e nenhum caso de HUS (CDC, 1997).

Em 2006, houve um surto nos EUA causado por espinafre pronto para o consumo contaminado. O espinafre contaminado foi distribuído por uma única fábrica para grande parte do país, causando pelo menos 199 casos de infecção (dos quais 102 foram hospitalizados e 31 desenvolveram HUS) e 3 mortes. Em função do ocorrido, as autoridades americanas recomendaram que a população não consumisse espinafre por um determinado período de tempo (MADIGAN *et al*, 2011).

Em 2009, uma fábrica de processamento de carne nos EUA enviou carne moída contaminada com *E. coli* O157:H7 para oito estados americanos, causando um grave surto de contaminação com a ocorrência de várias mortes (MADIGAN *et al*, 2011).

Em 2011, houve um surto em 9 estados dos EUA por consumo de alface contaminada. Até março de 2012, 58 pessoas haviam sido atingidas (38 só no estado do Missouri), 33 foram hospitalizadas e 3 desenvolveram HUS. Não houve registro de mortes (CDC, 2012).

Em 2011, a Agência de Proteção à Saúde britânica divulgou a investigação de um surto envolvendo 9 casos. Acredita-se que o surto esteja associado ao consumo de carne de caranguejo fornecida por uma das mais importantes empresas alimentícias do país.

II.2.2 – Protocolos utilizados na verificação de contaminação alimentar por *E. coli* O157:H7

Atualmente, para se detectar *E. coli* O157:H7 em amostras, são utilizados, principalmente, dois tipos de testes: métodos fenotípicos de detecção e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time* PCR).

Para a detecção fenotípica da *E. coli* O157:H7, é utilizada a metodologia tradicional e padronizada de alimentos para pesquisar a presença de bactérias. Essa metodologia depende do enriquecimento e identificação presuntiva de colônias em meios sólidos, seguida por testes bioquímicos e/ou sorológicos para realizar a identificação do microrganismo (MALORNY *et al.*, 2003). Este método de detecção, embora seja eficiente, requer vários dias ou semanas para disponibilizar os resultados definitivos. Além disso, as propriedades fenotípicas pela qual as bactérias são

identificadas nem sempre podem ser expressas, e quando expressas podem ser de difícil interpretação e classificação (THOLOZAN *et al.*, 1999).

A detecção de *E. coli* O157:H7 é baseada nas diferenças fenotípicas existentes entre os outros sorotipos, como a sua incapacidade de fermentar o sorbitol em Ágar McConkey e a ausência da atividade das β -glucoronidasas (ADAMS e MOSS, 2008). Quando o Ágar McConkey é utilizado para a pesquisa de *E. coli* O157:H7 e a bactéria está presente, colônias incolores são observadas. Outras bactérias da família Enterobacteriaceae formam colônias róseas (MARCH e RATMAN, 1986).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica bioquímica utilizada para amplificar uma ou algumas cópias de um pedaço de DNA, copiando milhões de vezes uma sequência específica de DNA (MULLIS, 1990). A PCR foi desenvolvida, em 1983, por Kary Mullis e lhe rendeu o Prêmio Nobel de Química, em 1993, conjuntamente com Michael Smith. Atualmente, é uma técnica muito utilizada em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas, possuindo diversas variações da técnica básica. A monitoração em tempo real da PCR é muito utilizada na identificação de agentes causadores de contaminação alimentar, pois possui alto grau de precisão e possibilita medir a quantidade de uma sequência específica de DNA ou RNA presente em uma amostra, embora demande alto custo e elevada exigência técnica para sua execução (FILION, 2012).

II.3 – A técnica neutrongráfica

Para se realizar uma Neutronografia, três dispositivos são essenciais: um feixe colimado de nêutrons; a amostra (objeto) a ser inspecionada; e um dispositivo para registrar a informação resultante da interação dos nêutrons com o material constituinte da amostra (DOMANUS, 1992). A figura II.3 ilustra a configuração de um sistema neutrongráfico.

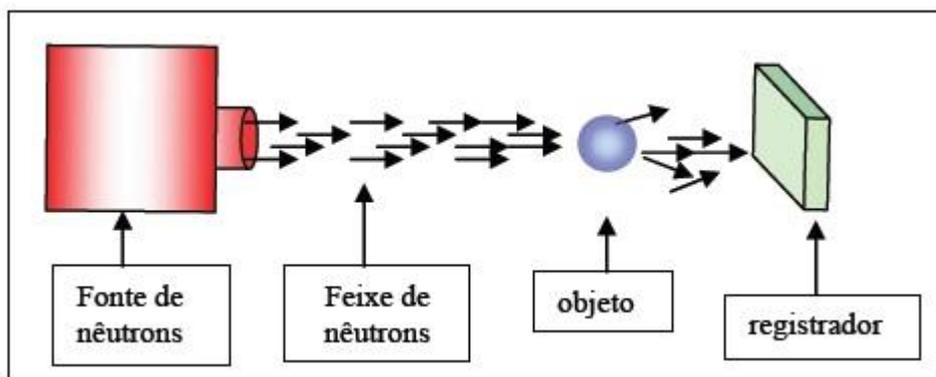


Figura II.3: Configuração do sistema montado para a realização de uma Neutronografia.

A interação dos nêutrons com a amostra ocorre diretamente com os núcleos dos átomos que a constituem, visto que os nêutrons não possuem carga elétrica. Assim, tanto os detectores de nêutrons quanto os sistemas de radiografia com nêutrons, usam a radiação secundária gerada da interação dos nêutrons com determinados materiais, conhecidos como conversores de nêutrons.

Existem alguns dispositivos para se registrar imagens neutronográficas quando acoplados a um conversor: filme radiográfico industrial; detector sólido de traços nucleares (SSNTD); e uma câmera CCD (charge-coupled device).

A técnica da Neutronografia com filme radiográfico é similar à de radiografia com raios X ou raios γ . Um feixe colimado de nêutrons incide sobre o objeto de estudo que, dependendo de sua constituição, irá modelar o feixe, já que os nêutrons podem ser capturados, espalhados ou nem sofrer interação. Os nêutrons transmitidos seguem em direção ao filme registrador, composto do acoplamento íntimo entre uma chapa radiográfica e a folha conversora de nêutrons. Os nêutrons, ao interagirem com os núcleos do conversor, são convertidos em radiação secundária (elétrons de conversão interna e radiação eletromagnética), capaz de sensibilizar o filme radiográfico, registrando a imagem do objeto.

Na Neutronografia com SSNTD, a amostra estudada é colocada junto a um material que seja sensível a partículas ionizantes e o conjunto é irradiado com um feixe colimado de nêutrons. A interação dos nêutrons com os átomos da amostra gera essas partículas ionizantes, que sensibilizam o detector e imprimem uma imagem sobre ele.

Para se obter uma imagem neutronográfica em tempo real, utiliza-se um conversor cintilador, que converte os nêutrons em fótons de luz. Os fótons são

capturados pela câmera CCD acoplada a um dispositivo eletrônico, formado por um circuito integrado, ligado a um computador, em cuja tela a imagem é visualizada. Esse sistema permite inspecionar eventos dinâmicos.

II.3.1 – Interação dos nêutrons com a matéria

Os nêutrons, por não possuírem carga elétrica, não sofrem interações envolvendo forças coulombianas. Interagem diretamente com os núcleos dos átomos com probabilidade de ocorrerem efeitos de espalhamento elástico e de absorção. Num espalhamento elástico, a estrutura nuclear não sofre alterações e a interação é uma simples transferência de energia cinética e de quantidade de movimento, semelhante ao que ocorre num choque elástico entre duas esferas rígidas. No processo de absorção, o nêutron é capturado pelo núcleo, e o estado energético do núcleons é alterado. Nesse processo, a energia não é conservada e uma fração dela excita o núcleo atingido, que tende a retornar ao seu estado fundamental, emitindo radiação eletromagnética. A partir desse estado excitado, há probabilidades (seção de choque) diferentes de ocorrer eventos dos tipos: espalhamento inelástico, captura radioativa e fissão nuclear (CRISPIM, 1993; ANDRADE, 2002).

A interação dos nêutrons com a matéria é um processo estatístico que depende da energia dos nêutrons incidentes para um evento ser o mais provável (KNOLL, 1999). Na tabela II.2 dispõe-se a classificação dos nêutrons pela energia.

Tabela II.2: Classificação dos nêutrons pela energia (LAMARSH, 1978).

Classe	Energia do nêutron	Subclasse	Energia do nêutron
Nêutrons lentos	$E < 10 \text{ keV}$	Nêutrons frios	$E < 0,01 \text{ eV}$
		Nêutrons térmicos	$0,01 \text{ eV} < E < 0,3 \text{ eV}$
		Nêutrons epitérmicos	$0,3 \text{ eV} < E < 10 \text{ keV}$
Nêutrons rápidos	$10 \text{ keV} < E < 20 \text{ MeV}$		
Nêutrons relativísticos	$E > 20 \text{ MeV}$		

Alguns elementos possuem seção de choque inelástica maior para nêutrons térmicos. Dessa forma, o aumento da probabilidade de interação do tipo inelástica dos nêutrons com a matéria conduz à moderação dos nêutrons.

A moderação dos nêutrons consiste na redução da sua energia, podendo transformá-los de rápidos à térmicos. Para tal, se usa um material, geralmente leve e com grande seção de choque de espalhamento, conhecido como moderador de nêutrons, que através de choques sucessivos, diminui a velocidade dos nêutrons e os leva até a faixa de energia desejada (KAPLAN, 1978).

Os materiais mais comuns utilizados como moderadores são os materiais hidrogenados, tais como a água e a parafina, já que o hidrogênio possui grande seção de choque de espalhamento para nêutrons, além dos materiais compostos com grafite.

II.3.2 – As fontes de nêutrons

As principais fontes de nêutrons empregadas em Neutronografias são: os reatores nucleares, os aceleradores de partículas e as fontes radioisotópicas. As principais características requeridas das fontes de nêutrons, para realização de uma Neutronografia, são a intensidade do fluxo neutrônico e o espectro de energia dos nêutrons. Essas características influem diretamente sobre o tempo de exposição e sobre a eficiência na formação da imagem, que dependem da colimação do feixe, que afeta a definição da imagem. Além desses fatores, também devem ser considerados o custo, a complexidade (de construção e operação) da fonte, a portabilidade e a atenção com a proteção radiológica. Os nêutrons emitidos pelas fontes são rápidos e devem ser moderados, para a realização de uma Neutronografia térmica. (CRISPIM, 1993). A tabela II.3 mostra as principais características das fontes de nêutrons.

Tabela II.3: Fontes emissoras de nêutrons (DOMANUS, 1992).

Tipo da fonte	Fluxo típico (n.cm ⁻² .s ⁻¹)	Resolução radiográfica	Tempo de exposição	Características
Reator nuclear	10 ⁵ a 10 ⁸	Excelente	Curto	Operação complexa; estável; custo de investimento entre médio e alto; não portátil.
Acelerador de partículas	10 ³ a 10 ⁶	Média	Médio	Operação “liga e desliga”; custo de investimento médio; portabilidade possível.
Radioisótopo	10 ¹ a 10 ⁴	Baixa a média	Longo	Operação fácil; estável; custo de investimento médio; portátil.

Mesmo com os reatores nucleares apresentando alto custo e complexidade de construção e operação, a maior parte das pesquisas envolvendo Neutronografias tem utilizado feixes de nêutrons provenientes deles. A principal vantagem está no fato de fornecerem altos fluxos neutrônicos, o que resulta em exposições neutronográficas mais curtas. A alta intensidade de nêutrons na entrada do colimador (10¹⁰ a 10¹³ n.cm⁻².s⁻¹) viabiliza a obtenção de um feixe bem colimado (10⁴ a 10⁹ n.cm⁻².s⁻¹ no plano da amostra), decorrendo, então, na produção de Neutronografias de alta resolução (CRISPIM, 1993).

As fontes isotópicas são uma alternativa ao reator nuclear, quando a portabilidade é necessária ou não existe um reator à disposição. As principais fontes isotópicas emissoras de nêutrons utilizadas são ¹²⁴Sb-⁹Be, ²⁴¹Am-⁹Be, ²⁴²Cm-⁹Be e ²⁵²Cf (CRISPIM, 1993). A tabela II.4 apresenta as características das fontes isotópicas emissoras de nêutrons.

Tabela II.4: Características das fontes isotrópicas (DOMANUS, 1992).

Fonte	Meia-vida	Tipo de reação	Produção de nêutrons (n/g.s)	Energia média dos nêutrons
$^{124}\text{Sb-}^9\text{Be}$	60 dias	(γ ,n)	$2,7 \times 10^9$	0,024MeV
$^{210}\text{Po-}^9\text{Be}$	138 dias	(α ,n)	$1,28 \times 10^{10}$	4,3 MeV
$^{226}\text{Ra-}^9\text{Be}$	1620 anos	(α ,n)	$1,3 \times 10^7$	4 a 6 MeV
$^{227}\text{Ac-}^9\text{Be}$	21,8 anos	(α ,n)	$1,1 \times 10^9$	4 a 6 MeV
$^{228}\text{Th-}^9\text{Be}$	1,91 anos	(α ,n)	$1,7 \times 10^{10}$	4 a 6 MeV
$^{236}\text{Pu-}^9\text{Be}$	86,4 anos	(α ,n)	$4,1 \times 10^7$	4 a 6 MeV
$^{241}\text{Am-}^9\text{Be}$	458 dias	(α ,n)	$1,0 \times 10^7$	4 a 6 MeV
$^{242}\text{Cm-}^9\text{Be}$	136 dias	(α ,n)	$8,5 \times 10^9$	4 a 6 MeV
$^{244}\text{Cm-}^9\text{Be}$	18,1 anos	(α ,n)	$2,1 \times 10^8$	4 a 6 MeV
^{252}Cf	2,65 anos	Fissão nuclear	$2,34 \times 10^{12}$	2,3 MeV

II.3.3 – A colimação do feixe neutrônico

A colimação representa um dos itens mais importantes para um sistema neutrongráfico. O colimador é o dispositivo responsável pelo alinhamento do feixe neutrônico, pela sua intensidade, no plano da imagem, e pela resolução geométrica da imagem neutrongráfica resultante. Ele tem a finalidade de extrair o feixe de nêutrons térmicos provindos do moderador e de direcioná-lo ao objeto a ser radiografado. Um esquema simplificado de um colimador divergente é mostrado na Figura II.4, onde L é o comprimento do colimador, D é o diâmetro da abertura do colimador junto à fonte e θ a divergência angular do feixe, dada por:

$$\theta = \arctan(D_0/2L) \quad (\text{II.1})$$

onde D_0 é o diâmetro na abertura do colimador junto ao plano de imagem.

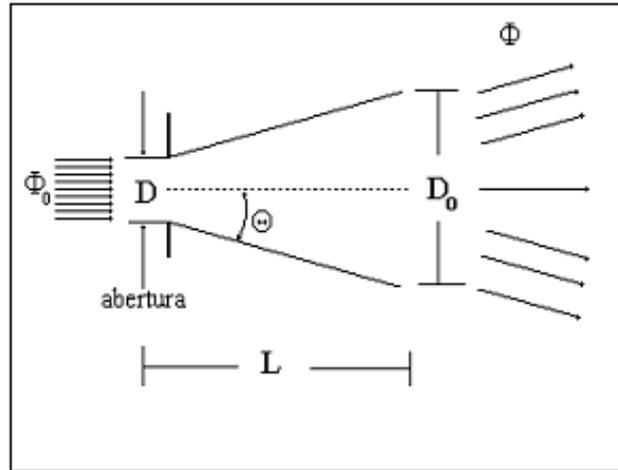


Figura II.4: Colimador divergente.

A razão de colimação, L/D , é o parâmetro que melhor descreve as características do colimador. O fluxo de nêutrons emergente, ou seja, no plano da imagem, pode ser estimado pela equação II.2.

$$\Phi = \Phi_0 \cdot A / 4 \cdot \pi \cdot L^2 \quad (\text{II.2})$$

onde:

Φ_0 é o fluxo neutrônico na base de entrada do colimador (isotrópico);

A é a área de base ou de abertura do colimador junto à fonte;

L é a distância entre a base de entrada do colimador e o plano de imagem.

Se um colimador de abertura circular for considerado, a área será expressa por $A = \pi D^2 / 4$ e a equação II.2 torna-se:

$$\Phi = \Phi_0 \cdot (\pi \cdot D^2 / 4) / 4 \cdot \pi \cdot L^2 \rightarrow \Phi = (\Phi_0 / 16) \cdot (D/L)^2 \quad (\text{II.3})$$

A razão entre os fluxos de nêutrons na entrada e saída do colimador é dada pela equação II.4.

$$\Phi / \Phi_0 = 16 \cdot (L/D)^2 \quad (\text{II.4})$$

Essa relação demonstra a perda significativa de nêutrons decorrente da colimação, já que a intensidade do feixe no plano de imagem decresce à medida que L cresce. Portanto, minimizar a razão L/D significa também minimizar o tempo de exposição. Por outro lado, o efeito de penumbra sobre a resolução espacial da imagem, usualmente conhecido como indefinição geométrica, também depende da razão de colimação L/D, como pode ser visto na Figura II.5, e demonstra a necessidade de se maximizar a razão L/D. O tamanho da região de penumbra geométrica, U_g , é dado pela seguinte relação:

$$U_g = (D/L_s) \cdot L_f \quad (II.5)$$

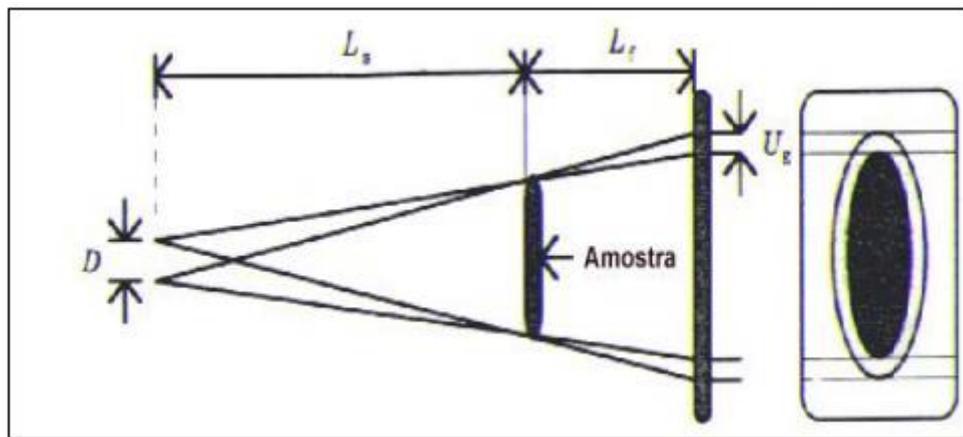


Figura II.5: Efeito de penumbra devido à divergência do feixe.

Quando a amostra é posicionada bem próxima ao sistema detector, ou seja, $L_f \ll L_s$ e $L_s \approx L$, a equação II.5 torna-se

$$U_g \approx (D/L) \cdot L_f \quad (II.6)$$

A equação II.6 mostra que a indefinição geométrica cresce linearmente com o decréscimo da razão L/D, ou seja, é inversamente proporcional a L/D. Assim, para se obter radiografias de boa qualidade é essencial otimizar-se a razão de colimação L/D e posicionar o objeto o mais próximo possível do detector. Como a distância objeto-detector pode ser pré-fixada, aumentar a razão L/D significa obter radiografias de boa qualidade. Isto pode ser feito aumentando-se o comprimento do colimador (L) ou diminuindo a abertura de entrada (D). Em ambos os casos, isso implicará numa redução

da intensidade do fluxo de nêutrons na saída do colimador e no consequente aumento do tempo de exposição (DOMANUS, 1992).

II.3.4 – A Neutronografia com CR-39

Devido à escassez de matéria prima no início da Segunda Guerra Mundial, a indústria de plástico se tornou uma excelente fonte de materiais substitutos. Naquela época, uma subsidiária da *PPG Industries*, a *Columbia Southern Chemical Company*, iniciou pesquisa inédita de obtenção de materiais não-termoplásticos, aqueles cujas propriedades físicas não se alteram em altas temperaturas. O projeto foi denominado pelos cientistas envolvidos como “Columbia Resins”. Em maio de 1940, a pesquisa resultou no monômero carbonato de alil-diglicol (ADC) e, nos anos seguintes, mais de 180 compostos diferentes deste monômero foram investigados e examinados. O 39º composto testado se destacou devido as suas propriedades peculiares e, mais tarde, ele foi usado para a produção de lentes orgânicas. A união do nome do projeto Columbia Resins com o fato do composto ter sido o 39º deu origem ao termo “Columbia Resin 39”, ou CR-39, que a PPG Industries anunciou como uma marca registrada. O CR-39 é um detector sólido de traços nucleares (SSNTD, sigla em inglês de *Solid State Nuclear Tracks Detector*) e sua composição química é $C_{12}H_{18}O_7$ (KALSI, 2008). A figura II.6 mostra uma placa de CR-39 não irradiada.

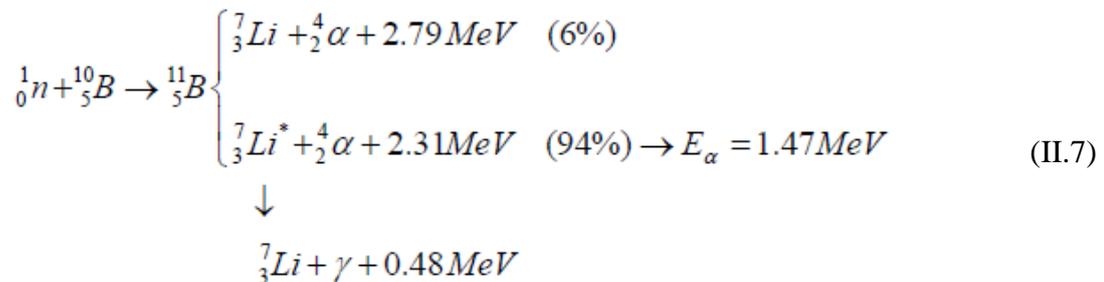


Figura II.6: Placa de CR-39 não irradiada (virgem).

O CR-39 é inerte aos nêutrons térmicos, mas é sensível às partículas alfa, sendo o detector plástico com maior eficiência. Para se realizar a conversão dos nêutrons térmicos em partículas alfa, que registram traços nucleares no polímero, torna-se necessária a junção dele a um conversor de nêutrons (CARTWRIGHT *et al*, 1978). Esses conversores devem ser produzidos com materiais de alta seção de choque de

absorção de nêutrons, de forma que um dos produtos da reação nuclear entre o nêutron e o material conversor seja uma radiação ionizante secundária. Existem dois tipos de materiais conversores: os de pronta emissão e os potencialmente radioativos. Nos de pronta emissão, a radiação secundária é emitida imediatamente após a absorção dos nêutrons; os potencialmente radioativos tornam-se instáveis e, depois, emite uma radiação secundária (MARASHI, 2000).

O boro-10 (^{10}B) é um dos elementos mais utilizados como conversor de nêutrons de pronta emissão, em função de sua elevada seção de choque de absorção, 3837 barns, para nêutrons térmicos incidentes (MARASHI, 2000). As reações nucleares prováveis de ocorrer entre um nêutron térmico e um núcleo de boro encontram-se representadas na equação II.7, onde o percentual entre parêntesis representa a probabilidade de ocorrência.



Em razão das características da reação $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ apresentadas, para se obter as imagens da estrutura das bactérias, suas paredes foram dopadas com o boro-10. A dopagem das bactérias ocorre no momento de sua incubação, para garantir a interação entre o microrganismo e o agente conversor. Submetendo-se a amostra de bactérias dopadas com boro ao feixe de nêutrons térmicos, verifica-se que os traços de partículas alfa mapeiam as estruturas dos microrganismos ali presentes. Os traços formados em porções não aglutinadas não são relevantes em comparação à imagem global obtida. As imagens formadas por essas partículas espúrias são chamadas de “ruído de fundo”. A imagem mostrada na figura II.7 esquematiza a formação da imagem das bactérias no CR-39.

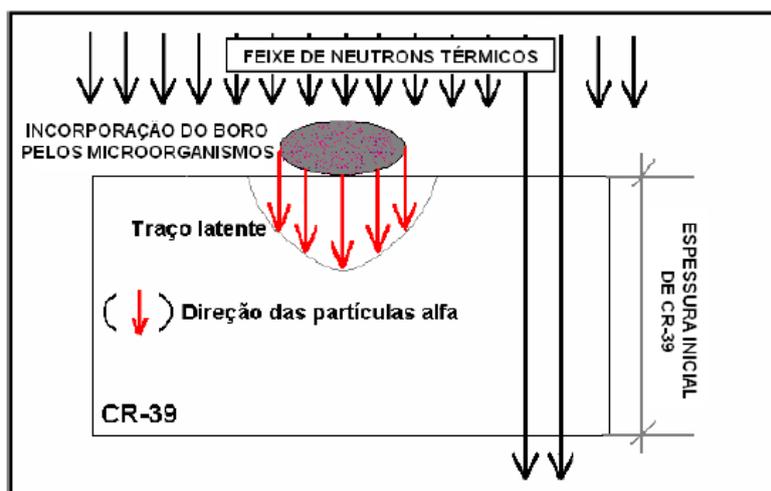


Figura II.7: Esquema da formação das imagens num SSNTD.

Quando a partícula alfa penetra num SSNTD, no caminho onde ocorre esta interação, surgem radicais livres e íons provenientes das interações coulombianas com os átomos do material. É possível analisar a região de interação com o auxílio de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), já que essa região se torna muito reativa ao ataque químico, o que evidencia os locais de interação, conhecidos como “traços latentes”, que são da ordem de 3 a 10 nm. Na figura II.8 observam-se ilustrações laterais da região de um SSNTD, onde ocorre a penetração de uma partícula alfa.

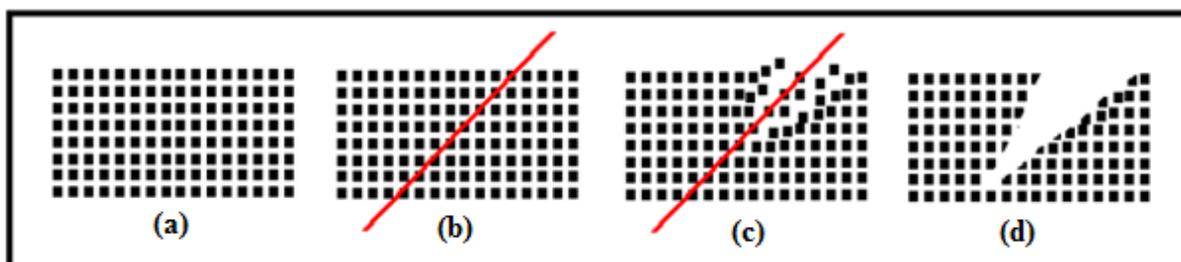


Figura II.8: Representação de um traço nuclear registrado pela penetração de uma partícula alfa em SSNTD (FLEISCHER, 1975). (a) Vista lateral da estrutura de um SSNTD, antes da interação com a partícula alfa; (b) Trajetória da partícula alfa; (c) Deformação do SSNTD, proveniente da ionização do material e ejeção de elétrons; (d) Traço latente deixado no SSNTD pela passagem da partícula alfa.

Os diâmetros dos traços latentes são da ordem de nanômetro, e, portanto, invisíveis a olho nu. Para torná-los visíveis, em nível de microscopia ótica, realiza-se a revelação desses traços por processo de ataque químico. Seguindo os protocolos

adotados por SILVA (2013), LIMA (2009), PAULA (2008), LOPES (2001) e WACHA (1998), banham-se as placas de CR-39 em solução de hidróxido de sódio (NaOH), para que a solução remova os íons formados ao redor do traços latentes e interaja mais nas regiões danificadas, tornando os traços mais homogêneos. Se a velocidade de desbaste da superfície externa do detector for isotrópica, ao final do processo de ataque ocorrerá a formação do traço revelado, com a aparência de um cone (DUPIN *et al*, 2005).

Após o processo de revelação, os traços atingem diâmetros da ordem de 1 a 10 μm , o que permite serem observados com auxílio de um microscópio óptico. A figura II.9 mostra o desenho esquemático de como ocorre o desgaste do CR-39, após o ataque químico.

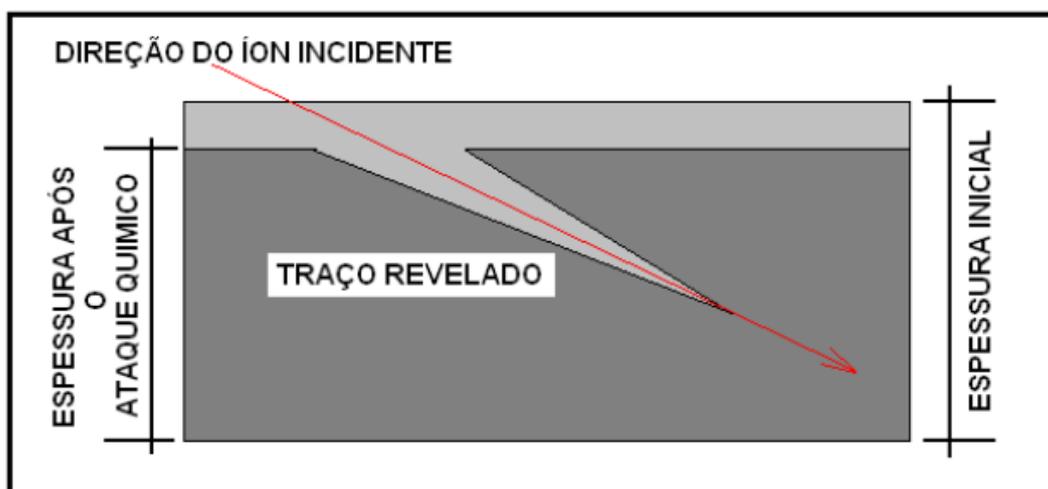


Figura II.9: Representação esquemática, segundo uma visão lateral, da formação de um traço revelado de uma partícula alfa num SSNTD (FLESICHER, 1975).

Nem todos os traços latentes no detector são reveláveis, já que uma fração das partículas alfa incide com ângulo inferior ou igual a um determinado ângulo característico do detector. Se o ângulo de incidência da partícula, θ , em relação à superfície do detector, for menor que um determinado ângulo, β , a velocidade de dissolução da superfície, V_d , excede a componente normal à superfície, $V_d \sin \theta$, e o traço não será visto ao final da revelação, ou seja, o material será removido tão rapidamente, que o ataque preferencial, ao longo da trajetória da partícula, será sobrepujado, fazendo com que ele não apareça após a revelação. Esse efeito ocorre para todos os traços inclinados em relação à superfície com um ângulo inferior a β , denominado “ângulo crítico” (FLEISCHER, 1975; NIKEZIC, 2004). A figura II.10

representa a geometria dos traços formados por partículas carregadas que incidem na superfície do detector em diversos ângulos, demonstrando que os traços com incidência inferior ao ângulo crítico β não são revelados.

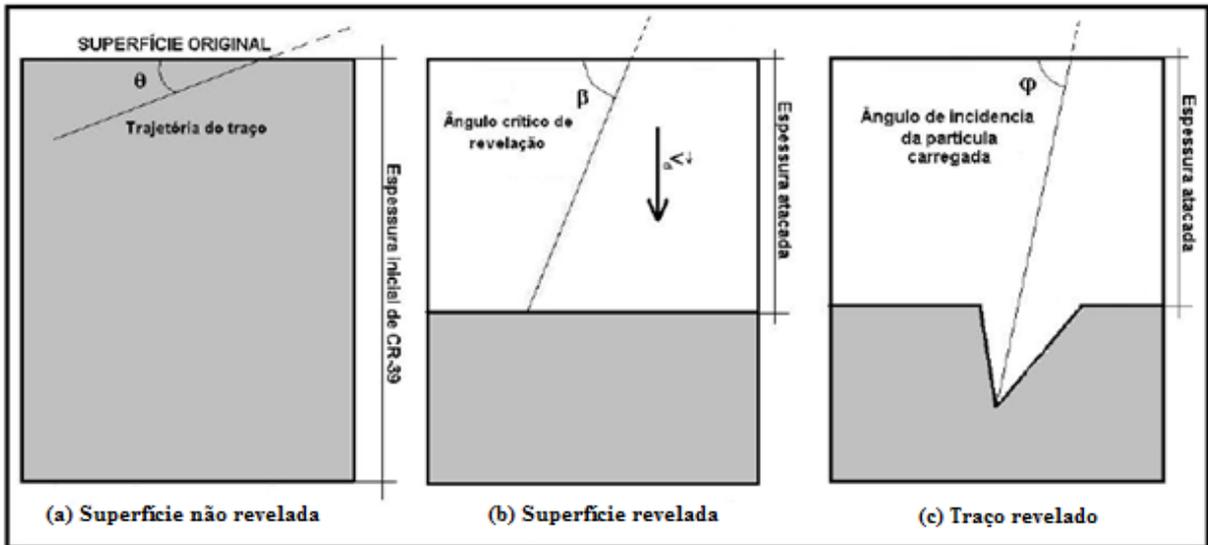


Figura II.10: Representação esquemática de alguns ângulos de incidência de uma partícula alfa num SSNTD. (a) Vista lateral da espessura do detector de traço, antes do ataque químico, com ângulo de incidência menor que o ângulo crítico; (b) Espessura atacada e ângulo crítico de revelação; (c) Espessura atacada e trajetória de partícula carregada (FLEISCHER, 1975).

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

Para que a análise das amostras siga um padrão e seja reproduzível, é necessária a definição de procedimento padrão, ou protocolo, que viabiliza a rápida e eficiente análise dos vegetais.

Trabalhos anteriores já comprovaram a eficiência da técnica neutronográfica para captura de imagens de micro-organismos, como mostraram SILVA (2013), LIMA (2009), PAULA (2008), LOPES (2001) e WACHA (1999). Dessa forma, acreditou-se que a mesma técnica poderia ser utilizada para indicar, de forma complementar, o nível de contaminação alimentar em vegetais crus ou semi-cozidos.

Em todos os ensaios realizados nesse trabalho foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* O157:H7, previamente adquirida pelo Laboratório de Micobactérias, no Instituto de Microbiologia da UFRJ. Com ensaios em diferentes legumes e verduras, com diferentes níveis de contaminação, desejava-se criar um parâmetro visual de contaminação, a partir da caracterização morfológica dos micro-organismos.

Todos os procedimentos realizados na parte experimental deste trabalho aconteceram em três locais: o preparo das amostras biológicas foi realizado no Laboratório de Micobactérias, no Instituto de Microbiologia da UFRJ; a irradiação das amostras foi realizada no reator Argonauta, localizado no Instituto de Engenharia Nuclear (IEN), ligado à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN); e a preparação do CR-39, a revelação dos traços nucleares e a captura das imagens foram realizadas no Laboratório de Neutronografia em Tempo Real (LNRTR) do Programa de Engenharia Nuclear (PEN), ligado à COPPE/UFRJ.

III.1 – Preparo do material e das amostras biológicas

Utilizando um estilete comum, são cortadas placas de aproximadamente 1 cm de lado de CR-39, de uma folha do detector. O CR-39 possui superfície muito lisa e, por isso, existe a necessidade de realizar um pré-ataque químico, visando aumentar a sua superfície de contato e a probabilidade das amostras se fixarem ao plástico. O pré-ataque químico é realizado colocando as placas de CR-39, já cortadas, imersas em

solução de hidróxido de sódio (NaOH), de normalidade 6,25N, a uma temperatura de 90°C, durante 15 minutos em uma unidade de banho termostatizado. Ao final desse período, as placas são retiradas da solução e lavadas com água destilada. Depois de lavadas, as placas devem ser colocadas sobre papel toalha comum e deixadas para secar ao ar livre por cerca de 15 minutos.

Após o pré-ataque, as placas de CR-39 devem ser coladas em uma superfície rígida, para facilitar a sustentação durante a irradiação. Nos ensaios realizados, as placas de CR-39 foram coladas com fita adesiva comum em uma placa quadrada, com cerca de 10 cm de lado, de alumínio (que é transparente aos nêutrons), e numeradas para posterior identificação.

As amostras dos vegetais são preparadas retirando-se uma pequena amostra do mesmo, preferencialmente da região mais externa do vegetal, adicionando-se 5µL de solução de borato de sódio na concentração de 5mg/mL à amostra e deixando-a descansar por 30 minutos, à temperatura de 37°C, para dopagem das bactérias com o boro. Após a dopagem, a amostra é macerada em um recipiente estéril (tubo de ensaio ou béquer). Em seguida, são retirados 5µL das do líquido proveniente dos vegetais (caso não seja formado líquido suficiente, deve-se adicionar 5µL de água destilada ao macerar o vegetal) que são colocados sobre as placas de CR-39, com o auxílio de uma micropipeta. Depois, as placas são postas sobre uma superfície aquecida a 60°C, por cerca de 3 minutos, para secagem e fixação da amostra no CR-39.

III.2 – Ensaios neutrongráficos com vegetais

Visando a aplicação prática, foram escolhidos para investigação de contaminação a batata e a alface, consumidas em larga escala no Brasil, além do pepino, que recentemente foi um dos principais causadores de contaminação alimentar por *E. coli* no mundo.

III.2.1 – Ensaio com crescimento de *E. coli* O157:H7 em batata

No primeiro ensaio realizado, foi escolhida a batata, em função do seu alto consumo e do seu alto teor de amido, que serve de substrato para o crescimento bacteriano.

Inicialmente, a batata foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos, para matar os demais micro-organismos, não permitindo a sua proliferação na etapa de crescimento. Em seguida, foi cortada uma fatia de aproximadamente 1 cm de espessura da batata e a mesma foi colocada no centro de uma placa de petri. A amostra de *E. coli* O157:H7 foi inoculada no centro da fatia, com um pequeno raspado da amostra original de bactéria, cultivada em caldo BHI, durante 24 horas, a 37°C, e a batata foi colocada em uma estufa com temperatura controlada, de aproximadamente 37°C, por 24 horas, para o crescimento bacteriano.

Após as 24 horas, o crescimento da colônia de bactérias na batata foi constatado visualmente. Por uma questão de segurança, a fatia de batata foi esterilizada, já que a visualização das bactérias pela técnica neutrográfica não depende da sua atividade, somente de sua estrutura morfológica. Para esterilização após o crescimento, foi raspada uma pequena amostra do centro da batata, e a esse raspado foram adicionados 10 µL de uma solução de formaldeído a 2,5% de concentração, e a mistura ficou em descanso por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a solução contendo as bactérias foi dopada com boro, adicionando-se 5 µL de solução de borato de sódio, na concentração de 5mg/mL, à solução, e incubando a mistura por 30 minutos à 37°C. Posteriormente 5 µL da amostra resultante foram colocados sobre duas placas de CR-39, para se obter uma amostra duplicada, por segurança.

Paralelamente foi realizado um ensaio com parâmetros idênticos, exceto a inoculação da bactéria. Esse ensaio sem bactérias serviu como grupo controle, para comparação dos resultados.

III.2.2 – Ensaio com inoculação controlada de *E. coli* O157:H7 em batata

Um novo ensaio foi realizado utilizando novamente a batata, contudo, nesse experimento não foi utilizado o crescimento da *E. coli* O157:h7 diretamente sobre a batata, visto que essa técnica não permite uma estimativa da quantidade de bactérias existente no vegetal e o conseqüente nível de contaminação.

Após o crescimento da *E. coli* O157:H7 por 24 horas, a 37°C, em caldo BHI, foi preparada uma solução contendo uma amostra das colônias de bactéria e água destilada. Essa solução foi diluída com água destilada até ser equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, o que nos dá um valor estimado de 10⁸ bactérias por mL de solução.

Através de diluições decimais sucessivas com água destilada, representadas na figura III.1, foram utilizadas as concentrações de 10^6 e 10^5 bactérias por mL.

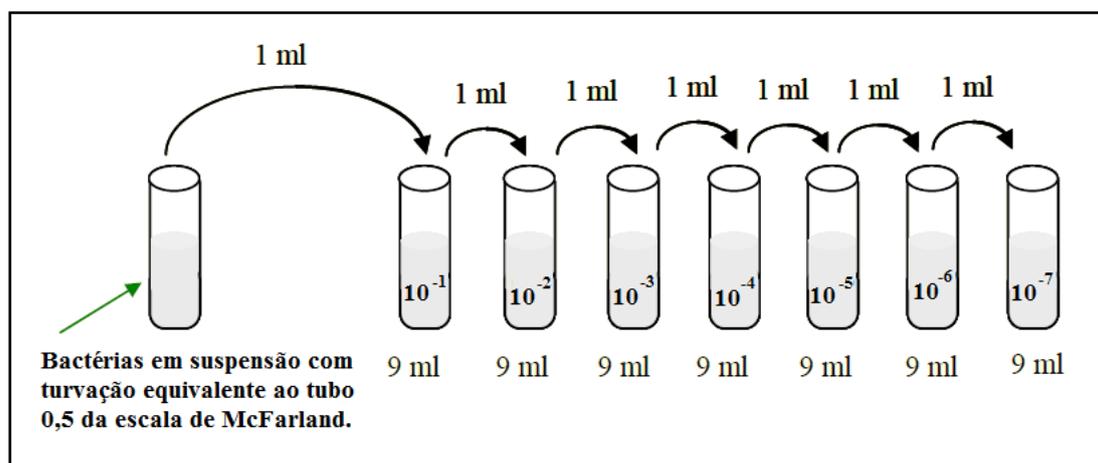


Figura III.1: Diagrama representativo do método das diluições decimais.

Para preparação das amostras, foram retirados pequenos pedaços de batata, previamente esterilizada, e aos mesmos foram adicionados $5\mu\text{L}$ das soluções de bactéria com concentração de 10^6 e 10^5 bactérias por mL. Para neutralizar as bactérias, novamente foram utilizados $5\mu\text{L}$ de formaldeído a 2,5% de concentração por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi macerada e foi feita a dopagem com boro, idêntica à do ensaio anterior. Do produto obtido, foram retiradas alíquotas de $5\mu\text{L}$ e colocadas sobre as placas de CR-39, sempre em duplicata.

Novamente foi realizado, em paralelo, o ensaio com parâmetros idênticos, exceto pela inoculação da bactéria. Esse ensaio sem bactérias serviu como grupo controle, para comparação dos resultados.

III.2.3 – Ensaio com crescimento de *E. coli* O157:H7 em pepino e alface

Em seguida, foi realizado um novo ensaio com o crescimento de *E. coli* O157:H7 diretamente em pepino e alface. Esses vegetais foram escolhidos pelo fato de serem consumidos crus e possuírem histórico de casos de contaminação alimentar bacteriana.

As condições desse ensaio foram idênticas às do primeiro ensaio. Inicialmente o pepino e alface foram esterilizados em autoclave, em seguida foram cortados pedaços dos mesmos e colocados em uma placa de petri. Um pequeno raspado da amostra de *E.*

coli O157:H7 cultivada em meio de cultura foi inoculado sobre os vegetais e eles foram colocados em uma estufa com temperatura controlada, de aproximadamente 37°C, por 24 horas, para o crescimento bacteriano.

Após o crescimento, os vegetais foram novamente esterilizados, por segurança. Para esterilizar os vegetais após o crescimento, foram coletados pedaços dos mesmos, na região de inoculação, e a eles foram adicionados 10 µL de uma solução de formaldeído a 2,5% de concentração, e a mistura ficou em descanso por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a bactéria foi dopada com boro e 5 µL da amostra resultante foram colocados sobre duas placas de CR-39.

Paralelamente foi realizado um ensaio com parâmetros idênticos, exceto a inoculação da bactéria. Esse ensaio sem bactérias serviu como grupo controle, para comparação dos resultados.

III.2.4 – Ensaio com inoculação controlada de *E. coli* O157:H7 em pepino e alface

Novamente foi realizado um ensaio com inoculação controlada de *E. coli* O157:H7, agora sobre pepino e alface, sem o crescimento diretamente sobre os vegetais.

As condições desse ensaio foram idênticas às do segundo ensaio. Novamente foi utilizada a escala de McFarland e as diluições decimais para estimar a concentração de bactérias na solução inoculada sobre os vegetais. Nesse experimento foram utilizados 0,5mL da solução de bactérias, somente na concentração de 10⁵ bactérias por mL, para facilitar a visualização das bactérias isoladamente.

Para preparação das amostras, foram retirados pequenos pedaços de pepino e alface, previamente esterilizados, e aos mesmos foram adicionados 5µL das soluções de bactéria na concentração de 10⁵ bactérias por mL. Para neutralizar as bactérias, novamente foram utilizados 5 µL de formaldeído, a 2,5% de concentração, por 10 minutos. Em seguida a mistura foi macerada e foi feita a dopagem com boro. Do produto obtido, foram retiradas alíquotas de 5 µL e colocadas sobre as placas de CR-39, sempre em duplicata.

Novamente foi realizado paralelamente um ensaio com parâmetros idênticos, exceto pela inoculação da bactéria. Esse ensaio sem bactérias serviu como grupo controle, para comparação dos resultados.

III.2.5 – Ensaio com pepino e alface *in natura*

Visando testar a técnica para situações reais, o ensaio anterior foi repetido sem a inoculação de bactérias. Dessa vez foram utilizadas somente a alface e o pepino. Vale observar que foram utilizadas somente as folhas mais externas da alface, que foi colhida direto de uma horta caseira, e o pepino comum comprado em mercado. Nenhum dos vegetais foi higienizado antes dos experimentos.

III.3 – Preparo das amostras para análise neutrongráfica

Depois da preparação das amostras biológicas sobre o CR-39, ainda é necessária a execução de três etapas para observação das imagens neutrongráficas das bactérias.

III.3.1 – Irradiação das Amostras

Para gerar a impressão das imagens das bactérias no CR-39, é necessário que as amostras sejam irradiadas numa fonte de nêutrons. A figura III.2 a seguir ilustra a irradiação das amostras.

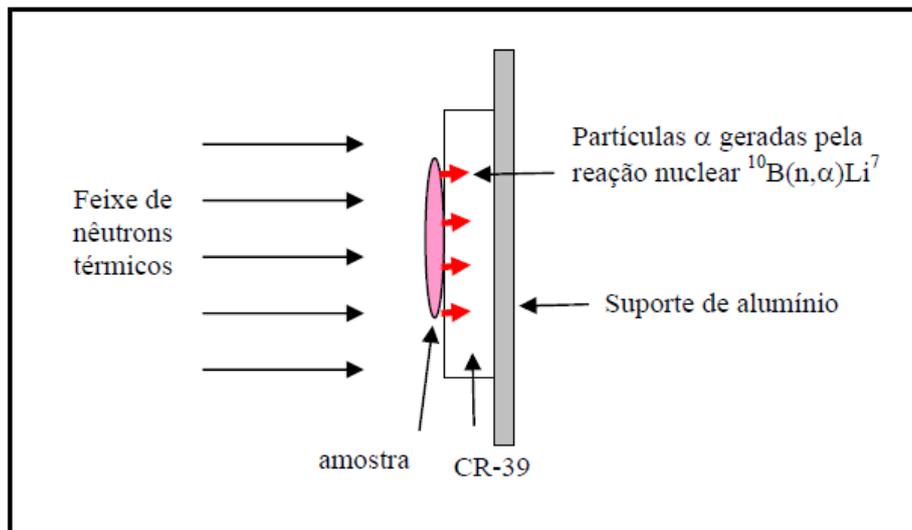


Figura III.2: Esquema de montagem experimental do conjunto amostra-detector junto ao feixe de nêutrons.

Em todos os ensaios realizados, as amostras foram irradiadas no canal J-9 do reator Argonauta, localizado no IEN/CNEN, mantido no estado de criticalidade e

operado à potência nominal de 340W. O canal de irradiação J-9 foi utilizado, porque nele está instalado um colimador divergente de grafita, de onde se extrai o feixe de nêutrons térmicos com as seguintes características, no plano da imagem: fluxo de nêutrons térmicos de $4,4 \times 10^5 \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$; razão de colimação, L/D, igual a 70; razão n/ γ de $3 \times 10^6 \text{ n.cm}^{-2}.\text{mrem}^{-1}$; e energia média dos nêutrons térmicos de 0,030 eV. Nessas condições, as amostras foram irradiadas por 30 minutos. A figura III.3 ilustra o desenho esquemático do canal de irradiação J-9 do reator Argonauta.

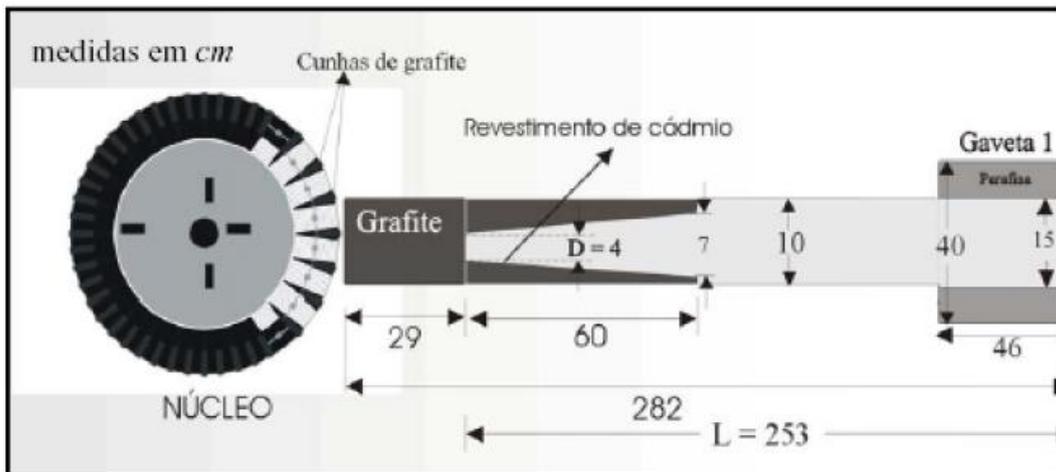


Figura III.3: Esquema da coluna térmica externa situada na parte frontal do reator Argonauta, com as medidas em centímetros (FERREIRA, 2003).

III.3.2 – Revelação de Traços Nucleares

Após a irradiação, existe a necessidade de se realizar o ataque químico às placas de CR-39, para ampliação dos traços nucleares, já que a imagem latente formada no CR-39 é composta por traços nucleares com diâmetro da ordem de alguns nanômetros, sendo assim invisíveis em um microscópio ótico. O ataque químico acontece de maneira similar ao pré-ataque químico: as placas de CR-39 são imersas em solução de NaOH a 6,25N, e mantidas a a 90°C, em banho termostatizado, durante 60 minutos. Após o processo de revelação química, as placas são lavadas com água destilada e, então, postas para secar sobre papel toalha, por cerca de 15 minutos.

III.3.3 – Captura de Imagens

Após a revelação dos traços nucleares, os traços registrados no CR-39 pelas partículas alfa, provenientes da interação dos nêutrons com o boro fixado nas bactérias, já foram ampliados de 1000x, e podem ser observadas num microscópio ótico convencional de transmissão.

Cada placa de CR-39 foi examinada num microscópio ótico de transmissão, modelo ECLIPSE E-400 da Nikon, dispendo de um conjunto de lentes ocular e objetiva que possibilitam ampliações diversas. As imagens foram capturadas por uma câmera fotográfica digital da marca Nikon, modelo Coolpix 995, que se encontra acoplada ao microscópio, cujo zoom ótico de 4x.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para fins de comparação entre as imagens, utilizou-se o mesmo nível de ampliação na obtenção de todas elas. A lente ocular utilizada no microscópio óptico fornecia uma ampliação de 10x, enquanto a lente objetiva escolhida, uma ampliação de 10x, além do zoom da câmera fotográfica, fixado em 4x. Dessa forma, a ampliação resultante sobre cada imagem foi de 400x.

Utilizou-se uma régua microscópica de forma a se dimensionar as bactérias, com precisão de 1 μm , como mostra a figura IV.1.

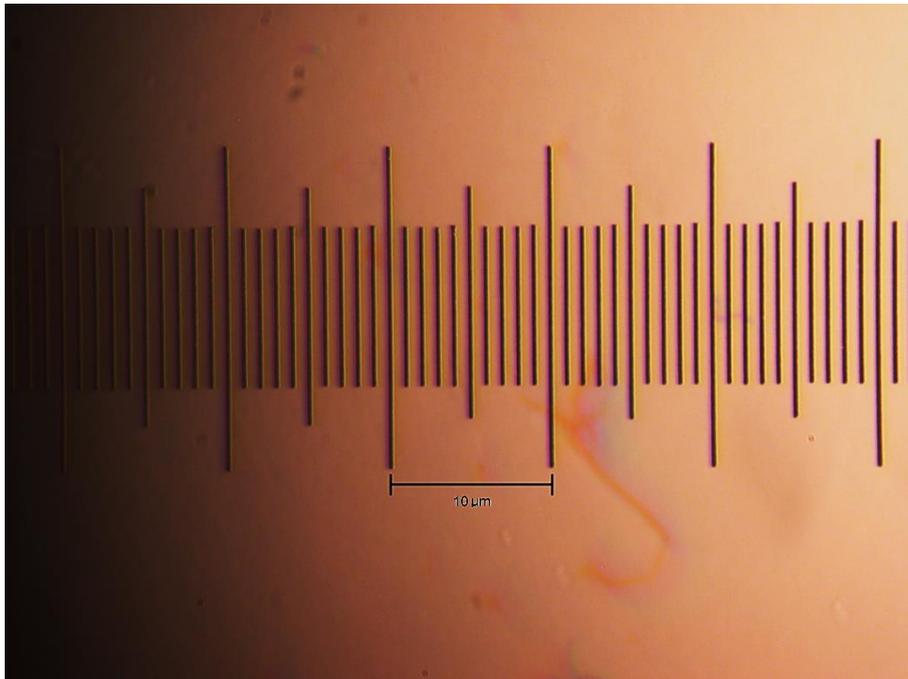


Figura IV.1: Imagem da régua microscópica com precisão de 1 μm , ampliada 400x.

A partir dessa imagem, obtida com a mesma ampliação utilizada para observação dos micro-organismos, foi criada uma escala padrão, que foi sobreposta digitalmente sobre as imagens de interesse com o uso do programa de tratamento de imagens Adobe Photoshop.

IV.1 – Ensaios com crescimento de *E. coli* O157:H7 em batata

O primeiro ensaio realizado teve como objetivo testar a técnica neutronográfica para visualização da *E. coli* O157:H7, simulando uma contaminação alimentar real. Dessa forma, optou-se por realizar o crescimento das bactérias diretamente num vegetal e, não, em meio de cultura. As bactérias foram inoculadas numa fatia de batata esterilizada – que apresenta ótimo substrato para o crescimento bacteriano – e a mesma permaneceu, durante cerca de 24 horas, numa estufa com temperatura de 37°C, favorável ao crescimento das bactérias.

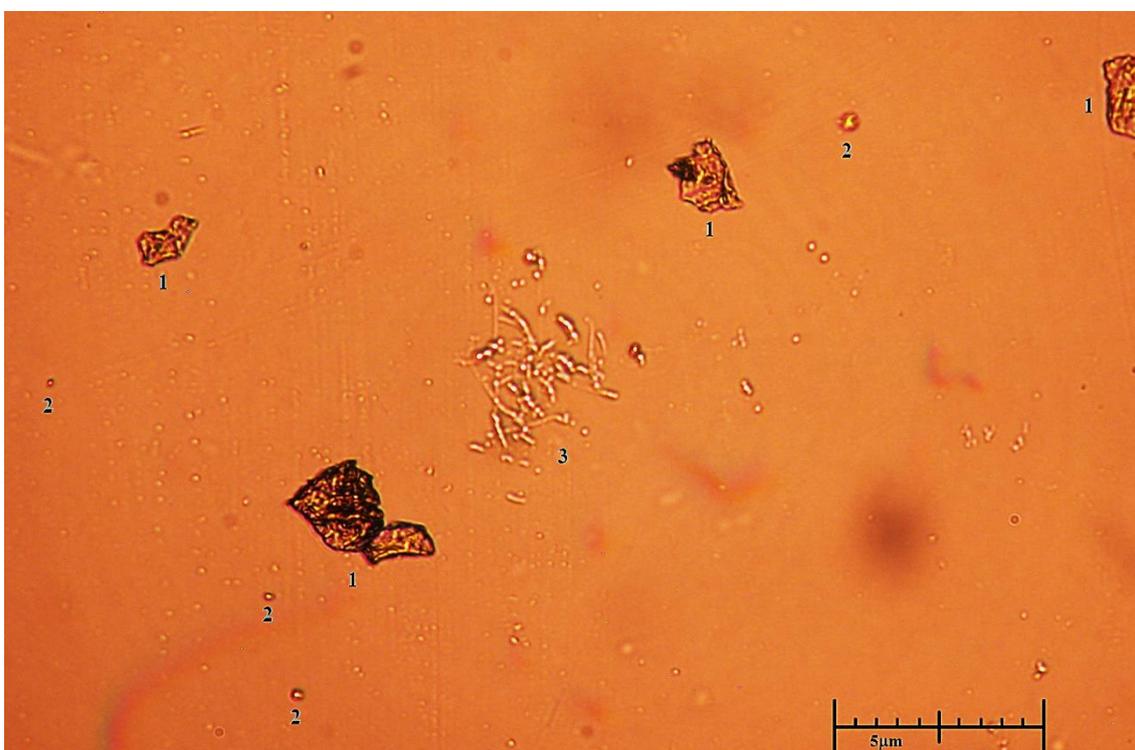


Figura IV.2: (1) defeitos do CR-39. (2) traços de partículas alfa. (3) aglomerado de *E. coli* O157:H7.

Na figura IV.2, diferenciam-se três elementos importantes, a saber: (1), defeitos decorrentes da fabricação ou de manuseio do CR-39; (2) traços isolados de partículas alfa resultantes da reação nuclear $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$; (3) aglomerado de bactérias *E. coli* O157:H7. Na figura IV.3 observa-se um zoom da região (3), onde se encontram as bactérias.

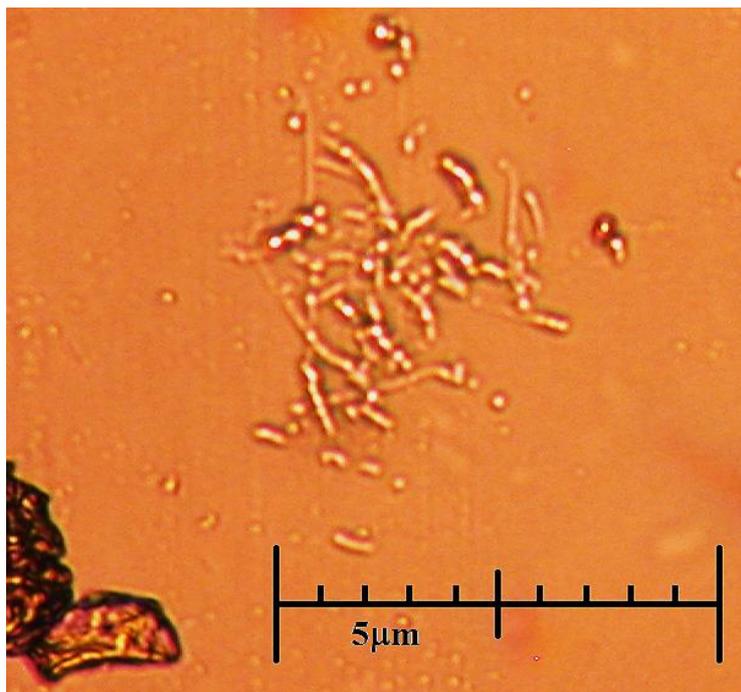


Figura IV.3: Ampliação da região onde se observou o aglomerado de bactérias, na figura IV.2.

Na figura IV.3, é possível se caracterizar diversas bactérias pelo formato de bacilo, com alguns micrometros de comprimento. Como a batata foi esterilizada antes da inoculação com *E. coli* O157:H7, sabe-se de antemão que se trata de uma bactéria específica. A morfologia dos micro-organismos observados nas imagens confere com a esperada.

Em função da grande aglomeração de bactérias, torna-se difícil a realização de uma análise quantitativa, dada pela contagem de micro-organismos presentes na imagem. Como a Neutrongrafia produz uma imagem bidimensional, também é possível haver bactérias sobrepostas em diferentes planos da imagem, o que dificulta a focalização correta e, conseqüentemente, a contagem de micro-organismos.

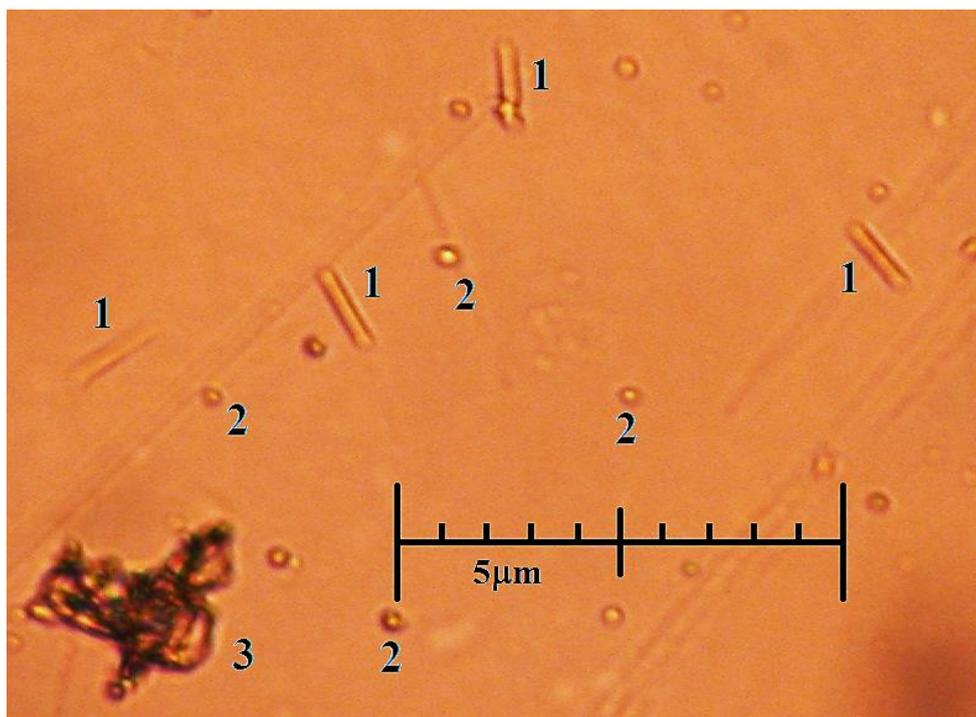


Figura IV.4: Imagem com bactérias isoladas.

Na figura IV.4, pode-se observar: (1) bactérias com morfologia características de um bacilo, com 2 μm a 3 μm de comprimento; (2) traços espúrios de partículas alfa; (3) defeito de fabricação ou manuseio do CR-39. A morfologia dos bacilos encontrados nas imagens confere com a citada na literatura, que atesta a eficiência da técnica neutrongráfica para diferenciar morfologicamente os micro-organismos em formato de bacilo.

IV.2 – Ensaios com inoculação controlada de *E. coli* O157:H7 em batata

Na sequência da pesquisa, foram realizados ensaios com quantidades controladas de *E. coli* O157:H7. A batata, após a esterilização, foi inoculada com concentrações de 10^5 e 10^6 bactérias por mL. Nas figuras IV.5 (a) e IV.5 (b), observam-se algumas imagens neutrongráficas obtidas dessas bactérias.

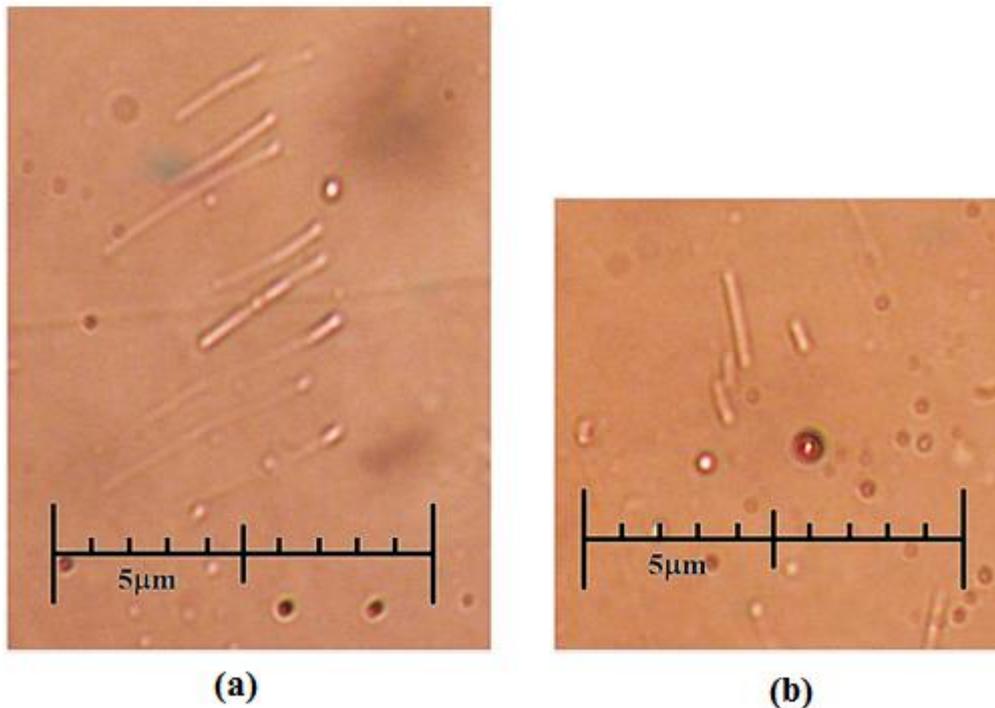


Figura IV.5: Imagens obtidas com a inoculação de *E. coli* O157:H7 em batata esterilizada: (a) Inoculação com concentração de 10^6 bactérias/mL. (b) Inoculação com concentração de 10^5 bactérias/mL.

Na figura IV.5, é possível se distinguir grupos de bacilos com características morfológicas da *E. coli*. Na imagem vista na figura IV.5 (a), obtida a partir da inoculação em maior concentração, é possível verificar uma maior aglomeração dos micro-organismos, dificultando a visualização do limite de sua estrutura morfológica, o que aumenta a imprecisão sobre a contagem de micro-organismos. Na figura IV.5 (b), a imagem obtida, a partir da inoculação com menor concentração, as bactérias são mais distintas, facilitando a realização de uma análise quantitativa. Em ambas as imagens há diversos traços espúrios de partículas alfa, facilmente diferenciados das bactérias. Comparativamente ao ensaio anterior, a caracterização morfológica e a contagem das bactérias são mais facilitadas, tendo em vista a menor aglomeração dos micro-organismos.

As imagens neutrongráficas obtidas de amostras de batata esterilizada, sem a inoculação por bactérias, ou seja, do grupo controle, serviram de comparação com os resultados apresentados anteriormente. Nenhuma imagem semelhante à de bacilos foi registrada, como se observa na figura IV.6.

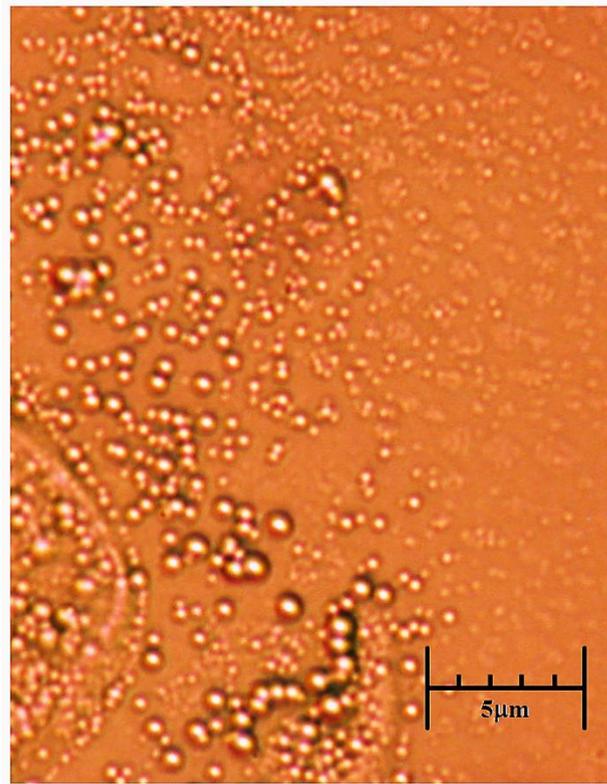


Figura IV.6: Imagem do grupo controle, sem a presença de bacilos.

IV.3 – Ensaio com crescimento de *E. coli* O157:H7 em alface e pepino

Considerando-se o breve histórico de surtos de contaminação alimentar por *E. coli* O157:H7, descrito no item II.2.1, verificou-se o crescimento bacteriano, por meio de testes com crescimento de *E. coli* O157:H7 em pepino e alface. As figuras IV.7 e IV.8 apresentam algumas imagens neutrongráficas relacionadas aos ensaios de crescimento de *E. coli* O157:H7, em alface e pepino, respectivamente.

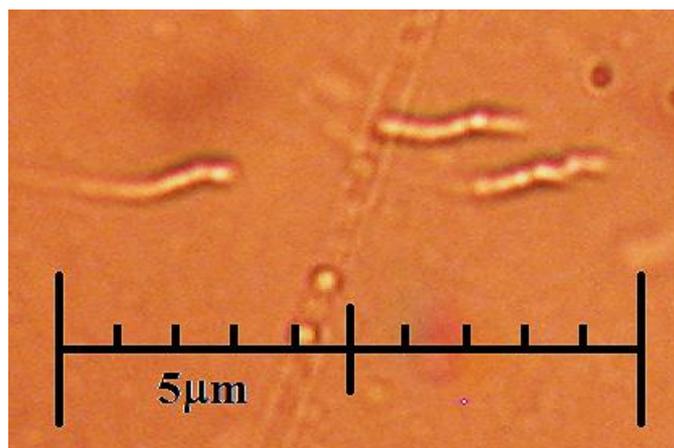


Figura IV.7: Cadeias de *E. coli* O157:H7, após crescimento por 24 horas, em alface.

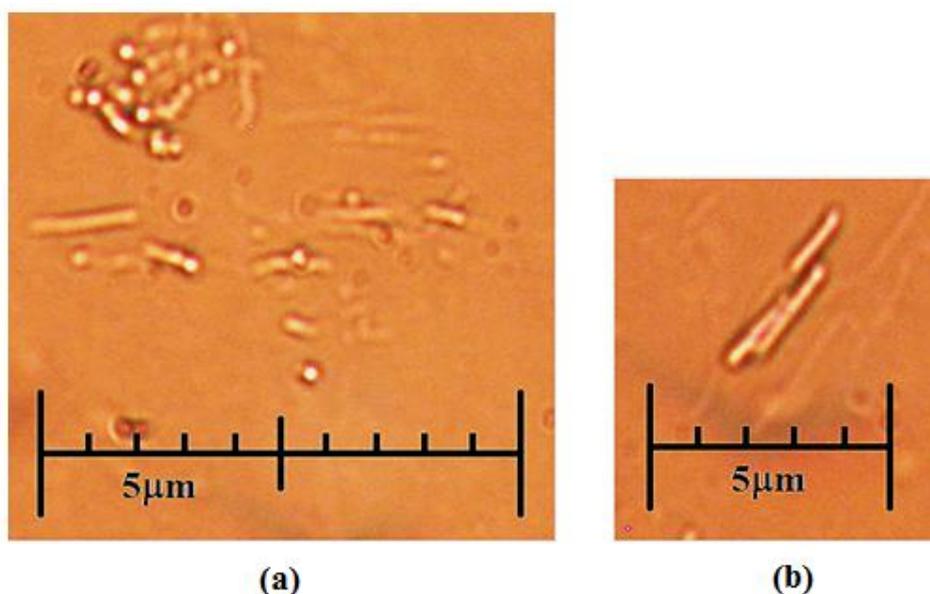


Figura IV.8: Bactérias, após crescimento por 24 horas, em pepino. (a) Aglomerado de bactérias e bactérias isoladas. (b) Aglomerado de bactérias.

As figuras IV.7 e IV.8 mostram imagens das *E. coli* O157:H7 isoladas ou em pequenos aglomerados. É difícil fazer alguma afirmação sobre a quantidade de bactérias, já que os limites das bactérias não estão bem definidos. Aparentemente, há bactérias ligadas, formando uma pequena cadeia, como se pode ver na figura IV.7.

Nas imagens relacionadas aos ensaios com crescimento de *E. coli* O157:H7 diretamente sobre alface e pepino, poucas bactérias ou aglomerados de bactérias foram notados, diferentemente do que aconteceu com os ensaios realizados com a batata. Esse fato possivelmente ocorreu, em função do substrato pouco favorável que a alface e o pepino oferecem para o crescimento da *E. coli*.

IV.4 – Ensaios com inoculação controlada de *E. coli* O157:H7 em alface e pepino

Nesses ensaios, foram novamente utilizados alface e pepino, previamente esterilizados, mas, agora inoculados com solução de *E. coli* O157:H7 contendo cerca de 10^5 bactérias/mL, sem crescimento bacteriano nos vegetais. As figuras IV.9 e IV.10 mostram as imagens neutrongráficas correspondentes a esses ensaios.

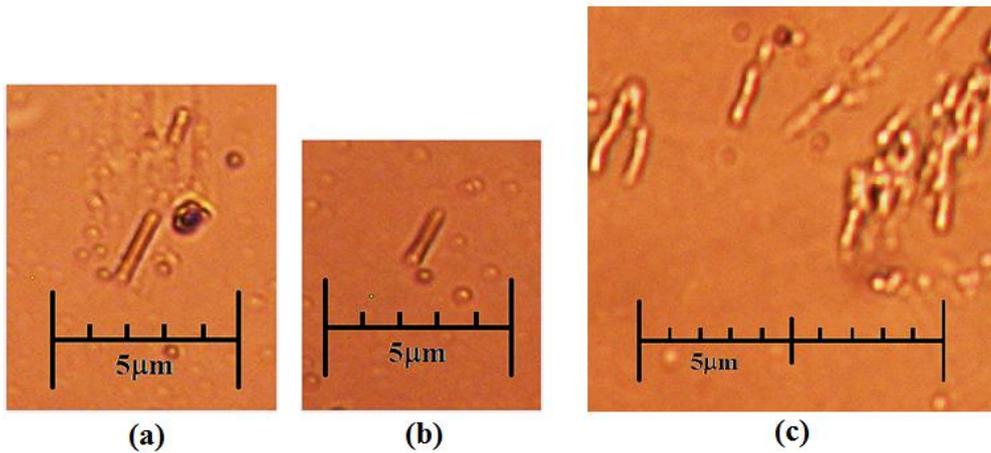


Figura IV.9: Bactérias isoladas em alface inoculado. (a) Dois bacilos de tamanhos diferentes e traços espúrios de partículas alfa; (b) Bacilo isolado e traços espúrios de partículas alfa; (c) Aglomerados de bactérias.

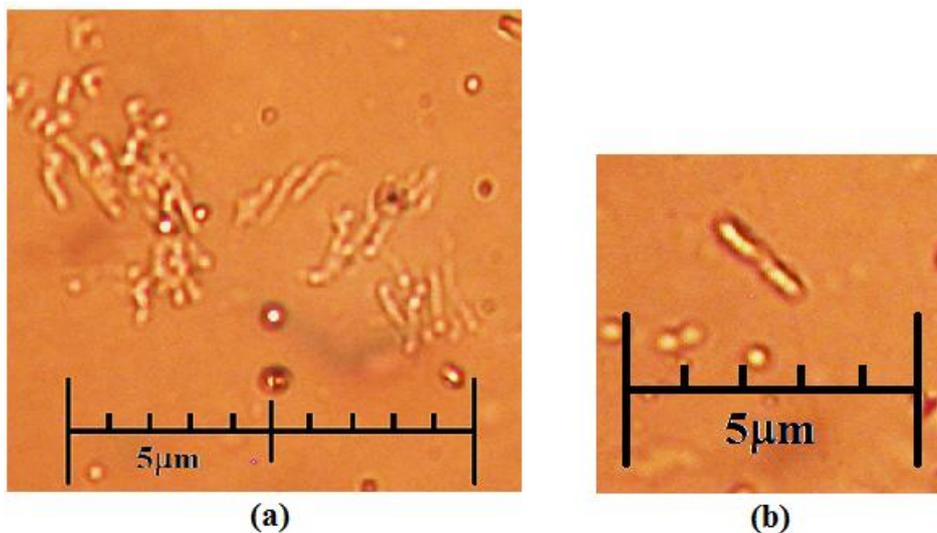


Figura IV.10: Bactérias isoladas em pepino inoculado. (a) Aglomerado de bactérias e traços espúrios de partículas alfa; (b) Dois bacilos enfileirados e traços espúrios de partículas alfa.

Nessas imagens neutrongráficas, nota-se que há regiões com aglomeração de bactérias, como nas figuras IV.9 (c) e IV.10 (a), e regiões onde elas se encontram isoladas, como nas figuras IV.9 (a), IV.9 (b) e IV.10 (b). Mesmo aglomeradas, é possível se caracterizar morfológicamente essas bactérias, o que não se verifica em relação às imagens dos danos no plástico e traços espúrios de partículas alfa.

As imagens neutrongráficas relativas aos ensaios com a alface e o pepino esterilizados e sem inoculação de *E. coli* O157:H7, ou seja, o grupo controle, foram utilizadas para comparação com os resultados obtidos, não apresentando nenhuma morfologia semelhante à de bacilos, como nas imagens onde ocorreu a inoculação.

IV.5 – Ensaios com alface e pepino *in natura*

Na etapa final do trabalho, os mesmos protocolos foram adotados, para se verificar a presença de bactérias em vegetais *in natura*. Alface e pepino, não inoculados e não esterilizados, foram utilizados para esta finalidade.

Nas imagens neutrongráficas resultantes dos ensaios realizados com a alface *in natura*, visualiza-se diversos bacilos com as mesmas características morfológicas da *E. coli*, como mostra a figura IV.11, identificada pelas marcações (1). Em nenhuma dessas imagens foram encontrados aglomerados de bactérias, o que torna possível a realização de uma análise quantitativa.

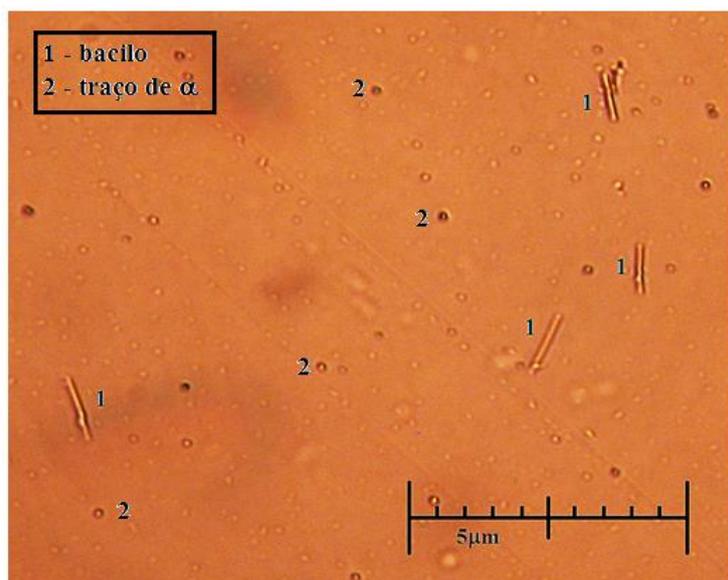


Figura IV.11: Imagens neutrongráficas de bacilos, caracterizados morfológicamente, presentes em amostra de alface *in natura*.

Nas imagens neutrongráficas decorrentes dos ensaios realizados com o pepino *in natura* também foram encontrados bacilos com as mesmas características morfológicas da *E. coli*, mas isoladamente, e em quantidade menor do que a encontrada no pepino inoculado. Na figura IV.12, observam-se as estruturas em forma de bastonete com alguns micrometros de comprimento, assinaladas por (1), dano de fabricação ou manuseio do no CR-39, assinalado por (2), e uma estrutura em forma de bastonete com cerca de 13 μ m de comprimento, assinalada por (3). Essa estrutura em (3) pode se tratar de um micro-organismo diferente de uma *E. coli*, ou de uma cadeia contendo vários bacilos enfileirados, com os limites imprecisos. Esse mesmo tipo de imagem foi encontrado nos ensaios com inoculação de *E. coli* O157:H7, onde se observou a inviabilidade de se fazer uma análise quantitativa.

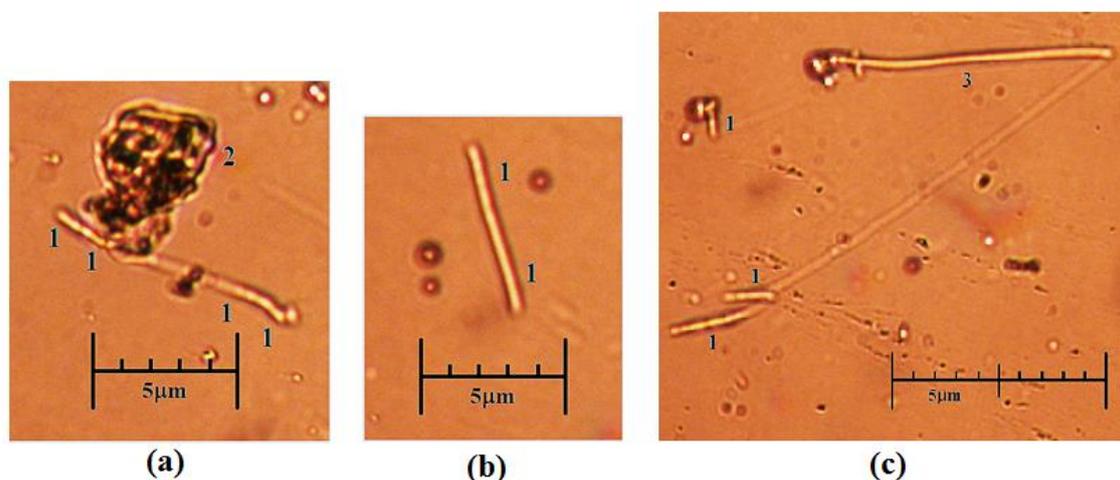


Figura IV.12: Imagens neutrongráficas das amostras de pepino *in natura*: (a) bacilos (1), caracterizados morfológicamente, traços espúrios de partículas alfa e de danos no CR-39; (b) correspondentes a dois bacilos (1) enfileirados; (c) correspondentes a de bacilos (1) ou cadeias de bacilos (3).

As características morfológicas das estruturas encontradas nas imagens são compatíveis com a citada na literatura e com aquelas obtidas com a inoculação de *E. coli* O157:H7. Contudo, não é possível afirmar que os bacilos das imagens são de *E. coli*, já que existem diversas bactérias com características morfológicas semelhantes às da *E. coli*. Para fazer essa diferenciação, é necessário a realização de testes bioquímicos ou de DNA.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Como se mencionou, pretendia-se caracterizar um protocolo, utilizando a técnica neutronográfica, que possibilitasse indicar a contaminação de vegetais pela visualização da presença das bactérias, paralelamente às técnicas convencionais. Desta forma, foram tomados como referência os protocolos utilizados por SILVA (2013), LIMA (2009), PAULA (2008), LOPES (2001) e WACHA (1998) em seus trabalhos, aplicando-os aos vegetais crus.

No primeiro ensaio realizado, como o crescimento bacteriano se deu diretamente na batata, não foi possível se estimar uma ordem de grandeza da quantidade de bactérias presentes nas amostras. Também se verificou uma forte tendência à aglomeração das bactérias, inviabilizando uma contagem acurada dos micro-organismos. Mesmo assim, o ensaio cumpriu seu objetivo de testar a técnica para visualização dos micro-organismos.

No segundo ensaio, empregando-se concentrações menores de bactérias nas amostras, notou-se uma maior separação delas, mas, por vezes, a visualização dos limites das bactérias ainda se resultou dúbia.

No terceiro ensaio, realizado com vegetais *in natura*, foi possível caracterizar, mesmo que em pequena quantidade, micro-organismos com formas de bacilo, de mesma morfologia da *E. coli*. Somente essas características não são suficientes para afirmar a contaminação dos vegetais, mas a presença de bactérias, possivelmente *E. coli*, pode ser um fator indicativo da contaminação deles.

A partir do protocolo neutronográfico estabelecido, foi possível se verificar que esta técnica forneceu resultados satisfatórios, apresentando boa qualidade de imagem para visualização dos micro-organismos. Verificou-se também que a estrutura dos vegetais não impossibilitou a detecção das bactérias, capacitando a técnica para os fins propostos.

Por dispensar a realização de uma série de etapas necessárias às outras técnicas, a Neutronografia se mostrou uma ferramenta poderosa na rápida detecção da presença de

micro-organismos nos vegetais, podendo alertar para uma possível contaminação alimentar.

Levando-se em consideração a duração do ensaio, a utilização da Neutrongrafia se apresentou vantajosa, em relação às demais técnicas, pois possibilitou a verificação da contaminação dos vegetais em cerca de três horas.

Neste estudo, a Neutrongrafia se apresentou como uma técnica complementar às tradicionais, utilizando as imagens das bactérias como fator indicativo de uma contaminação. Contudo, somente a detecção visual das bactérias não é uma ferramenta conclusiva para determinação da contaminação por bactérias dos vegetais, visto que os vegetais naturalmente apresentam uma pequena quantidade de micro-organismos, normalmente inofensivos à saúde humana.

A técnica neutrongráfica também não possibilita realizar a identificação dos micro-organismos, visto que as imagens obtidas nos permitem somente caracterizar a morfologia das bactérias. Existem diversas bactérias, nocivas ou não ao homem, com as mesmas características morfológicas, e a sua diferenciação só pode ser feita através de ensaios bioquímicos ou de DNA.

Uma sugestão a ser explorada em trabalhos futuros se refere ao desenvolvimento de um protocolo quantitativo para identificação de contaminação alimentar em vegetais ou carnes, utilizando a técnica neutrongráfica, tendo como base a contagem das bactérias nas imagens neutrongráficas. Para isso, torna-se necessário se basear nas técnicas tradicionais de contagem de bactérias e na legislação vigente.

Referências Bibliográficas

ACHESON, D. W. K., Foodborne Infection. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.15, n.6, p. 538-545, 1999.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology**. 3 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008. 490 p.

ANDRADE, M. L. G. **Caracterização de Sistemas Filme-Convertor para Radiografia com Nêutrons**. 2002. Dissertação de M. Sc., IPEN/CNEN/USP, São Paulo. 2002.

BASTOS, P. A. M. B. **Sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 em Iogurtes**. 2009. Tese de D.Sc. Faculdade de Veterinária/UFF, Bom Jesus do Itabapoana. 2009.

BROOKS, G. F., BUTEL, J. S., MORSE, A. S., **Microbiologia médica**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 653p.

CARTZ, L. **Nondestructive Testing**. Wisconsin: ASM International, 1995. 229p.

CDC. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized comercial apple juice – British Columbia, California, Colorado and Washington. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.45, n44, p.975, 1996.

CDC. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider – Connecticut and New York. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.46, n.01, p.4-8, 1997.

CDC. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating alfafa sprouts – Michigan and Virginia. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.46, n.32, p.741-744, 1997.

CDC. **Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce**. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/032312/index.html>>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2013.

CRISPIM, V. R. **Desenvolvimento de Ensaios Não-Destrutivos com Neutronografias**. 1993. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.1993.

DOMANUS, J. C., **Practical Neutron Radiography**. 1ª ed., Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1992. 292p.

DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; MENG, J. et al. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C.: Academic, 1997. p.171-191.

DUPIN, I. S., SELMINI, M. C., BALAN, A. M. O. “Traços em CR-39: Análise por microscopia óptica e software image pró-plus”. **Ciência e Tecnologia**, v.12, n. 4, p. 265-272, 2005.

FENG, P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: Novel vehicles of infections and emergence of phenotypic variants. **Emerging Infectious Diseases**, v.1, n.2, p.1-9, 1995.

FERREIRA, F. J. O. **Detecção de explosivos plásticos e narcotráficos, aplicando neutrografia em tempo real, aliada à tomografia computadorizada por transmissão**. 2008. Tese de D.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 2008.

FILION, Martin (Ed.). **Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2012. 242p.

FLEISCHER, R. L., PRICE, P. B., WALKER, R. M., **Nuclear tracks in solids**. Berkeley: University of California press, 1975. 605p.

FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 182p.

GARCIA, P. M. et al. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.5, p.1241-1249, 2008.

KAPLAN, I. **Física Nuclear**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A., 1978. 633p.

KARMALI, M. A., Infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, 1989.

KNOLL, G. F. **Radiation detection and measurement**. 4ªed., Hoboken :John Wiley & Sons. 1979. 860p.

Kodak. **Radiography in Modern Industry**. 4ªed., New York: Eastman Kodak Company, 1980. 212p.

KUNTZ, T.B.; KUNTZ, S.T. Enterohemorrhagic *E. coli* infection. **Primary Care Update Ob/Gyns**, v.6, p.192-196, 1999.

LAMARSH, J. R., **Introduction to Nuclear Reactor Theory**. Boston: Addison-Wesley Publishing Company, 1978. 585p.

LENNETTE, E. H., BALOWS, A., HAUSLER, W. J., SHADOMY, H. J., **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1985. 1149p.

LIMA, C. T. S., **Ensaio Neutronográfico para Estudo Morfológico de Micobactérias**. 2009. Tese de D.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 2009.

LOPES, J. D. R., **Caracterização Morfológica e análise Quantitativa de Bactérias *in vitro* por Técnicas Nucleares de Medidas**. 2001. Tese de D.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 2001.

MADIGAN, Michael T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13ª ed., San Francisco: Benjamin Cummings, 2011. 1152p.

MALORNY, B; PANAYOTIS, T.T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. v.83, n.1, p.39-48, 2003.

MARASHI, M. K. Analysis of Absorbed Dose Distribution in Head Phantom in Boron neutron Capture Therapy, **Nuclear Instrumentes and Methods in Physics Research A**. v, 440, p. 446-452, 2000.

MARCH, S.B.; RATMAN, S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.23, p.869-872, 1986.

MENEZES, M. O. **Radiografia com Nêutrons em Tempo-Real**. 2000. Tese de D.Sc., IPEN/CNEN, São Paulo. 2000.

MENG, J., DOYLE, M. P., ZHAO, T. *et al.* Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in food Science & Technology**, v. 51, 1994.

MULLIS, K. B., **Target amplification for DNA analysis by the Polymerase Chain Reaction**. *AnnBiolClin*, p. 579-82, 1990

NIH, **Scanning electrons micrograph of *Escherichia coli*, grown in culture and adhered to a cover slip**. Disponível em:

<http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/biodefenserelated/e_coli.jpg>.

Acesso em: 04 de setembro de 2013.

OLSEN, S. J., MACKINON, L. C., GOULDING, J. S. *et al.* Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, n.SS01, p.1-51, Mar. 17, 2000.

PAULA, A. G. **Levantamento de Protocolos Para a Investigação de Contaminação da Água, Utilizando a Caracterização Morfológica de Bactérias por Neutronografia**. 2008. Tese de M.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 2008.

SILVA, J. M. I. **Caracterização Morfológica de Micobactérias Não Tuberculosas Ambientais por Ensaio Neutronográfico**. 2013. Tese de D.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 2013.

SILVA, Neusely et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, p. 167-173. Mai./Ago., 2003.

THOLOZAN, J. L.; CAPPELIER, J.M.; TISSIER, J.P.; DELATTRE, G.; FEDERIGHI, M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.3, p.1110-1116, 1999.

WACHA, R. **Deteção de Micro-organismo em Meio de Cultura pela Técnica Neutronográfica**. 1999. Dissertação de M.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 1999.

WACHA, R. **Deteção de Partículas Virais Através da Técnica Neutronográfica**. 2004. Tese de D.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 2004.

WEAGANT, S. D., BRYANT, J. L., JINNEMN, K. G., An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **EHEC outbreak: update 14**. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/06/ehec-outbreak-update-14>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2013.