

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CEZAR AUGUSTO BELTRAME**

**ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM PLACAS DE  
POLIETILENO NOVAS E USADAS E REMOÇÃO COM DIFERENTES  
SANITIZANTES**

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**MARÇO, 2014**

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES**  
**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM PLACAS DE  
POLIETILENO NOVAS E USADAS E REMOÇÃO COM DIFERENTES  
SANITIZANTES**

**CEZAR AUGUSTO BELTRAME**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**MARÇO, 2014**

**ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM PLACAS DE  
POLIETILENO NOVAS E USADAS E REMOÇÃO COM DIFERENTES  
SANITIZANTES**

Cezar Augusto Beltrame

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Campus de Erechim.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Geciane Toniazzo, D. Sc.  
Orientadora

---

Prof. Rogério Luis Cansian, D. Sc  
Orientador

---

Profa. Gertrudes Corção D. Sc  
UFRGS – Porto Alegre

---

Profa. Laura Beatriz Rodrigues, D. Sc  
UPF – Passo Fundo

---

Prof. Marcelo Mignoni, D. Sc  
URI – Campus de Erechim

---

Profa. Clarice Steffens, D. Sc  
URI – Campus de Erechim

Erechim, março de 2014.



**NESTA PÁGINA INSERIR A FICHA CATALOGRÁFICA**

**Dedico este trabalho especialmente ao meu falecido pai Waldemar Beltrame que teve a brilhante ideia de investir nos estudos de seus filhos e com coragem nos tirou de uma pequena cidade e levou sua família de onze pessoas para morar em Santa Maria no Rio Grande do Sul onde meus estudos começaram.**

**Dedico também a minha mãe Arnilda Karsten Beltrame pelo seu amor e carinho, aos meus irmãos, Carlos Alberto, Carmen Regina, Cladis Salete, Clair de Fátima, Paulo Roberto, Claiton André, Angelo Ernesto, Jeanderson Luis.**

**Dedico a minha esposa Simone pelo carinho e apoio, ao meu enteado e companheiro Guilherme e ao meu filho Pedro pela alegria trazida a nossa casa.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Cansian e a professora Geciane pelas orientações, pelo incentivo, por todo apoio, que muito ajudaram na condução deste trabalho.

Ao Pessoal do Laboratório Marcela, Tássia, Gabriela, Lindomar, Ieda e a todos, pelo seu esforço e dedicação que muito contribuíram para o andamento dos trabalhos.

A Clarice, a Juliana, a Débora, pela ajuda nos artigos e na finalização do trabalho.

A todas as pessoas que colaboraram, de alguma forma, na realização deste projeto.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

**ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli* EM PLACAS DE POLIETILENO NOVAS E USADAS E REMOÇÃO COM DIFERENTES SANITIZANTES**

**Cezar Augusto Beltrame**

**Março/2014**

Orientadores: Geciane Toniazzo e Rogério Luis Cansian.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* utilizando ácido peracético, clorexidina e ácidos orgânicos como agentes ativos, determinando os respectivos valores D, Z e F e verificar a adesão bacteriana e formação de biofilmes em superfícies de corte de polietileno novas e usadas, impregnadas com *Escherichia coli* e *L. monocytogenes*, e avaliada a sua remoção usando diferentes concentrações de sanitizantes (ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos). Baixos valores de D foram obtidos para o ácido peracético e clorexidina, em comparação com os ácidos orgânicos. Para reduzir 6 log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes*, utilizando ácido peracético nas concentrações de 0,2%, 0,1%, e 0,05% foram necessários 7,08, 31,08 e 130,44 min de contato, respectivamente. Os modelos matemáticos de valores F mostraram que em concentrações abaixo de 0,15% pode-se verificar um aumento exponencial nos valores F, tanto de clorexidina como ácido peracético. Em relação a avaliação da adesão bacteriana, os resultados demonstraram que o número de células aderidas aumentou com o tempo de contato tanto nas superfícies novas como nas usadas. Uma concentração de 0,5% de ácido peracético foi eficaz para eliminar a *E. coli* em ambas as superfícies, enquanto que 0,2% foi eficaz apenas em superfícies novas. O hipoclorito de sódio removeu as células aderidas de *E. coli* em superfícies novas e usadas com 0,5 e 2%, respectivamente. A clorexidina e os ácidos orgânicos mostraram efeitos similares com redução total da adesão de *E. coli* empregando 0,8 e 2% em superfícies novas e usadas, respectivamente. Dentre os sanitizantes testados para remoção de *L. monocytogenes*, o ácido peracético e o hipoclorito de sódio apresentaram melhores resultados, removendo a adesão em todos os tempos de contato nas superfícies testadas. A clorexidina, na concentração máxima testada (2,0%) permitiu o crescimento microbiano em superfícies novas e usadas após 72 horas de contato. Os ácidos orgânicos apresentaram baixa eficiência, observando-se crescimento microbiano na concentração de 2,0% de sanitizante em 3 horas de contato em superfícies usadas, e em 6 horas de contato em superfícies novas.

Abstract of Doctoral Thesis submitted to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for the Degree of Doctor in Food Engineering.

**ADHESION OF *Listeria monocytogenes* AND *Escherichia coli* IN NEW AND USED POLYETHYLENE BOARDS AND REMOVAL WITH DIFFERENT SANITIZERS**

**Cezar Augusto Beltrame**

**March/2014**

Advisors: Geciane Toniazzo and Rogério Luis Cansian.

The initial aim of this study was to evaluate the kinetics of inactivation of *Listeria monocytogenes* using peracetic acid, chlorhexidine and organic acids as active agents, determining their D, Z and F values. We also observed the bacterial adhesion and biofilm formation in new and used polyethylene cutting boards impregnated with *Escherichia coli* and *L. monocytogenes*, and evaluated its removal using different concentrations of sanitizers (peracetic acid, chlorhexidine, sodium hypochlorite and organic acids). Low D-values were obtained for peracetic acid and chlorhexidine as compared to organic acids. To reduce 6 log<sub>10</sub> of *L. monocytogenes* using peracetic acid in concentrations of 0.2%, 0.1%, 0.05% are required 7.08, 31.08 and 130.44 min of contact, respectively. The F values of mathematical models have shown that at concentrations below 0.15% is observed an exponential increase in F values of chlorhexidine as well as peracetic acid. Regarding the assessment of bacterial adhesion, the results showed that the number of adhered cells increased with the contact time in both new and used surfaces. A concentration of 0.5% of peracetic acid was effective to eliminate *E. coli* on both surfaces, whereas 0.2% was effective only on new surfaces. Sodium hypochlorite removed adhered cells from *E. coli* with 0.5 and 2% in new and used surfaces, respectively. Chlorhexidine and organic acids showed similar effects with total reduction of adhesion of *E. coli* using 0.8 and 2% on new and used surfaces, respectively. Among the sanitizers tested for removal of *L. monocytogenes*, peracetic acid and sodium hypochlorite produced better results removing the adhesion at all times contact in the tested surfaces. Chlorhexidine, on highest concentration tested (2.0%) allowed microbial growth in new and used surfaces after 72 hours of contact. Organic acids showed low efficiency, observing microbial growth in concentration of 2.0% of sanitizer in 3 contact hours for used, and 6 contact hours in new surfaces.

**SUMÁRIO**

LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1. Higienização na indústria de alimentos .....	17
2.1.1 Sanitizantes.....	19
2.1.1.1 Ácido Peracético.....	19
2.1.1.2 Digluconato de clorexidina.....	20
2.1.1.3 Ácidos Orgânicos.....	20
2.1.1.4 Hipoclorito de Sódio.....	22
2.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.3 Inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> em suspensão .....	25
2.4 Adesão bacteriana .....	26
2.4.1 Técnicas para determinação da adesão bacteriana.....	29
2.5 Biofilmes bacterianos .....	31
2.6 Superfícies utilizadas no processamento de alimentos.....	36
3. ARTIGO 1.....	40
3.1 Resumo .....	40
3.2 Aplicações Práticas .....	40
3.3 Introdução .....	41
3.4 Material e Métodos.....	42

3.5 Resultados e Discussão .....	44
3.6 Referências Bibliográficas .....	48
4. ARTIGO 2.....	50
4.1 Resumo .....	50
4.2 Introdução .....	50
4.3 Material e Métodos.....	52
4.3.1 Superfície avaliada para a adesão bacteriana .....	52
4.4 Resultados e Discussão .....	54
4.4.1 Adesão de E. coli em superfícies de processamento de alimentos.....	54
4.4.2 Eficiência do ácido peracético na adesão de Escherichia coli.....	55
4.4.3 Eficiência de Clorexidina sobre a adesão de Escherichia coli.....	58
4.4.4 Eficiência de ácidos orgânicos sobre a adesão de Escherichia coli.....	59
4.4.5 Eficiência de hipoclorito de sódio sobre a adesão de Escherichia coli.....	60
4.4.6 Avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos.....	62
4.5 Conclusões.....	65
4.6 Referências Bibliográficas .....	66
5. ARTIGO 3.....	70
5.1 Resumo .....	70
5.2 Introdução .....	70
5.3 Material e Métodos.....	72
5.3.1 Superfície avaliada para a adesão bacteriana .....	72
5.4 Resultados e Discussões .....	74

5.4.1. Adesão de <i>Listeria monocytogenes</i> em superfícies de corte pela contagem padrão em placas.....	74
5.4.2 Eficiência do ácido peracético na remoção de <i>L. monocytogenes</i> .....	75
5.4.3 Eficiência do clorexidina na remoção de <i>L. monocytogenes</i> .....	77
5.4.4 Eficiência dos Ácidos Orgânicos na remoção de <i>L. monocytogenes</i> .....	78
5.4.5 Eficiência dos Hipoclorito de Sódio na remoção de <i>L. monocytogenes</i> .....	79
5.4.6 Avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos.....	81
6. CONCLUSÃO.....	87
7.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:3.1</b> Valores D experimentais e modelos preditivos para ácido peracético, clorexidina e ácidos orgânicos para diferentes concentrações. ....	44
<b>Tabela 2:4.1</b> - Contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células de E. coli aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de ácido peracético (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%). ....	56
<b>Tabela 3:4.2</b> - Contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células aderidas de E. coli em placas de cortes novas e usadas, em 72 horas, com diferentes concentrações de clorexidina (0, 0.2, 0.5, 0.8 e 2 %). ....	59
<b>Tabela 4:4.3</b> - Contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células aderidas de E. coli em superfícies de cortes novas e usadas, durante 72 horas, com diferentes concentrações de ácidos orgânicos (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%). ....	60
<b>Tabela 5:4.4</b> - Contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células aderidas de E. coli em superfícies de corte novas e usadas, durante 72 horas, sanitizadas com diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%). ....	61
<b>Tabela 6:5.1</b> - Contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células de L. monocytogenes aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de ácido peracético (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%). ....	75
<b>Tabela 7:5.2</b> - Contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células de L. monocytogenes aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de clorexidina (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%). ....	77
<b>Tabela 8:5.3</b> - Contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células de L. monocytogenes aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de ácidos orgânicos (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%). ....	78
<b>Tabela 9: 5.4</b> - Contagem (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) de células de L. monocytogenes aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%). ....	80



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:2.1</b> – Etapas do desenvolvimento do biofilme.( KASNOWSKI, M.C. et al. .34	
<b>Figura 2:3.1-</b> Valores de $F$ e modelos matemáticos obtidos para a redução microbiana de $1.10^3$ para $1.10^3$ UFC/cm <sup>2</sup> (desinfecção) com valores $D$ obtidos pelos modelos preditivos de cada sanitizante diferente.....	46
<b>Figura 3:4.1-</b> Quantificação de <i>E. coli</i> em placas de cortes novas e usadas sem a presença de sanitizantes.....	55
<b>Figura 4:4.2</b> - Redução da contagem inicial da adesão de <i>E. coli</i> em superfícies de corte novas e usadas, durante 3h, sanitizadas com 0,5% de ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos.....	62
<b>Figura 5:4.3</b> - Eficiência entre os diferentes sanitizantes testados (ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos) em superfícies de corte novas e usadas, para <i>E. coli</i> com 1h de contato. ....	64
<b>Figura 6:5.1:</b> Quantificação de <i>E. coli</i> em placas de cortes novas e usadas sem a presença de sanitizantes.( TN= Superfícies novas; TU = Superfícies usadas )......	74
<b>Figura 7:5.2</b> - Redução da contagem inicial da adesão de <i>E. coli</i> em superfícies de corte novas e usadas, durante 3h, sanitizadas com 0,5% de ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos.....	81
<b>Figura 8:5.3</b> - Concentração necessária para a remoção total de <i>L. monocytogenes</i> em superfícies de cortes novas.....	82
<b>Figura 9:5.4</b> - Concentração necessária para a remoção total de <i>L. monocytogenes</i> em superfícies de cortes usadas.....	83

## 1. INTRODUÇÃO

Os consumidores a nível mundial estão mais preocupados com a qualidade e a segurança dos alimentos que ingerimos, a doenças causadas por alimentos contaminados são cada vez mais divulgadas sejam pelos meios de comunicação

normais, jornais, revistas, televisão ou pelos novos meios de comunicação como a Internet através de suas redes sociais.

A divulgação além de ajudar a prevenir também ajuda as pessoas a entenderem melhor o que são estas contaminações, de onde podem vir, levando as indústrias produtoras de alimentos a melhor se prepararem para atender este novo consumidor mais exigente, além de atender a novas regulamentações que tendem a serem criadas de modo a criar uma produção de alimentos mais seguros, como menos riscos aos seus consumidores.

Uma das principais fontes de contaminações de alimentos são as superfícies as quais os mesmos são expostos, sendo assim tornam-se uma grande preocupação para as indústrias as condições higiênicas das mesmas, tornando-se necessário um estudo maior sobre os procedimentos de higiene nessas superfícies bem como os produtos a serem utilizados na higienização e sanitização das superfícies.

A utilização de novos produtos para sanitização de superfícies vem sendo estudada, como forma de se adequar a processos muitas vezes difíceis de serem controlados ou para substituírem produtos que podem deixar residuais em superfícies de contato com alimentos, um dos produtos que pode ser utilizado na sanitização das superfícies é a mistura de ácidos orgânicos, que hoje ainda não está sendo utilizada para este fim. Este produto não deixa residuais nocivos e tem tido boa utilização em conservação de alimentos, entrando diretamente em contato com os alimentos.

Doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados são uma das principais causas de morbidade em diversos países e, em certas circunstâncias, podem ter sérias consequências (MORRELI, 2008).

Apesar do uso de técnicas de processamento de alimentos e de higienização industrial avançadas, o número crescente e a gravidade das doenças de origem alimentar em todo o mundo têm aumentado consideravelmente, o que chama a atenção dos consumidores em relação à qualidade dos alimentos. Atualmente, a segurança alimentar constitui uma preocupação para os consumidores e para a indústria de alimentos, bem como para órgãos responsáveis pela saúde pública (MORRELI, 2008).

Ainda neste sentido, um grande problema para a indústria de alimentos são as condições higiênicas de superfícies de equipamentos processadores de

alimentos por serem fontes potenciais de micro-organismos deterioradores e patogênicos. A higiene de equipamentos e de utensílios caracteriza-se, fundamentalmente, por adoção de procedimentos em que as superfícies que entram em contato com os alimentos tornam-se sanitariamente adequadas para o processamento. Para isso, devem-se utilizar técnicas corretas de higienização para a garantia de qualidade do produto final.

A contaminação microbiana em superfícies de contato é uma grande preocupação para a indústria de alimentos, visto que sob condições favoráveis, as células bacterianas podem aderir às superfícies e reproduzirem-se. Se não forem completamente removidas, essas células podem contribuir para a formação de uma complexa comunidade microbiana o que comprometerá a qualidade e segurança dos alimentos. A formação de biofilmes pode ocorrer em praticamente todas as superfícies envolvidas no processamento de alimentos, desde as rugosas que apresentam fissuras e fendas que podem alojar os micro-organismos até as consideradas mais lisas (MORRELI, 2008, FLACH et al., 2005).

A escolha de um sanitizante adequado é muito importante para o alcance de um resultado final satisfatório nos índices microbiológicos, mas para isso é necessário um conhecimento do tipo de problema que se quer tratar e também da eficiência do sanitizante frente ao meio utilizado e aos micro-organismos presentes. Entretanto, as empresas fornecedoras dos mesmos os indicam para qualquer problema, pois quase todos afirmam que a eficiência do produto é grande para vários micro-organismos.

Existe hoje uma carência de dados e materiais técnico-científicos isentos de interesse que possam auxiliar os profissionais responsáveis por esta importante área de higienização nas indústrias de alimentos, dificultando assim a tomada de decisões mais precisas e economicamente mais viáveis as indústrias, sem ocasionar riscos a saúde dos consumidores.

Neste contexto, este trabalho tem por objetivos: 1) avaliar a cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão, usando clorexidina, ácido peracético e ácidos orgânicos como agentes ativos, determinando os respectivos valores D, permitindo calcular o valor Z e os diferentes valores F; 2) verificar a adesão bacteriana e formação de biofilmes em superfícies utilizadas no processamento de alimentos, empregando *Listeria monocytogenes* e *Escherichia*

*coli*; 3) verificar a eficiência dos sanitizantes na remoção dos biofilmes de *L. monocytogenes* e *E. coli*

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Higienização na indústria de alimentos

Higienização são os processos combinados de limpeza e sanificação, que aplicados à produção de alimentos tem por finalidade assegurar ao consumidor um produto final de qualidade (HAYES, 1993).

A higienização na indústria de alimentos está inserida no contexto das Boas Práticas de Fabricação (BPFs) e dos programas de qualidade como o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Assim, seu objetivo final é a obtenção de alimentos seguros, particularmente sob os aspectos associados às contaminações com agentes químicos, físicos e microbiológicos, além de contribuir para a manutenção das características sensoriais e nutritivas desses alimentos, sendo importante também para o controle da contaminação cruzada durante a produção (MORRELI, 2008).

A indústria de alimentos deve propor limites de segurança que deverão ter um sistema de monitoramento, de medição e de registro com frequência definida para assegurar que o procedimento será efetivo e o que foi estabelecido será alcançado. Dentro dos limites estabelecidos, pode-se considerar que os perigos químicos, físicos e ou microbiológicos serão controlados. Dentre desses controles estão incluídos, por exemplo: i) as concentrações dos princípios ativos das soluções sanitizantes; ii) as concentrações dos detergentes; iii) as recomendações de qualidade microbiológica estabelecida com critério técnico para superfícies higienizadas, ambientes de processamento, manipuladores e de equipamentos (ANDRADE et al., 2008).

Todas as superfícies de processamento de alimentos são lugares potenciais para a adesão bacteriana, que podem ocorrer até mesmo quando programas de limpeza e sanitização são corretamente aplicados. Deste modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície (ROSSONI & GAYLARDE, 2000).

Os mecanismos de ação dos sanitizantes estão se tornando mais claros, o que permite que seus efeitos sobre os micro-organismos sejam preditos. Sendo assim, surge o seguinte problema: uma interrupção de 10 semanas na sanitização

depende na prática de mais que um fator. No mínimo quinze fatores parecem influenciar a possível resistência da cepa microbiana (ASSELT et al., 1998).

De acordo com Germano & Germano (2001), a sanificação tem por objetivo eliminar micro-organismos presentes em locais que não foram removidos pela limpeza. Deve-se selecionar sanitizantes que i) sejam aprovados pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura; ii) apresentem amplo espectro de ação antimicrobiana e capazes de destruir rapidamente os micro-organismos; e iii) sejam estáveis sob variadas condições de uso e que possuam baixa toxicidade e corrosividade (ANDRADE et al., 2008).

Os principais pré-requisitos que devem ser levados em conta para um agente químico ser utilizado como desinfetante são: apresentar amplo espectro de ação antimicrobiana; ser capaz de inativar rapidamente os micro-organismos; não ser corrosivo para metais; não danificar artigos ou acessórios de borracha ou plástico, nem equipamentos ópticos; sofrer pouca interferência de outros produtos químicos; ser inodoro ou ter odor agradável; não ser irritante para a pele e mucosas; possuir baixa toxicidade; tolerar pequenas variações de temperatura e de pH (PELCZAR et al., 1996).

É importante ressaltar que existem fatores que podem alterar a ação dos sanitizantes, esses podem ser fatores físicos (características das superfícies, concentração da solução); fatores químicos (pH e dureza da água) e a contaminação biológica (presença de micro-organismos e matéria orgânica na água) (HAYES, 1993; ANDRADE & MACEDO, 1996; PINTO, 2000).

A sanitização pode ser feita pelo uso de métodos físicos ou químicos. Em geral, os métodos físicos são preferidos quando estão disponíveis e não deixam resíduos. Entretanto, os métodos físicos não podem ser sempre aplicados em função de restrições, como, temperatura, segurança de pessoal e desenho do equipamento. Nesses casos, são utilizados os sanitizantes químicos (ASSELT & GIFFEL, 1998).

Existe uma grande variedade de sanitizantes químicos disponíveis, como, compostos clorados, compostos iodados, compostos de amônia quaternária, ácido peracético e peróxido de hidrogênio. Há outros compostos que podem ser usados em formulações de sanitizantes, como aldeídos (por exemplo, glutaraldeído), fenóis (por exemplo, triclosan), biguaninas (por exemplo, clorexidina) e alcoóis (ASSELT & GIFFEL, 1998).

### **2.1.1 Sanitizantes**

Operações de higiene geralmente aplicadas na indústria de alimentos são assumidas para controlar a formação de biofilmes sobre as superfícies de contato com os alimentos (METTLER & CARPENTIER, 1998). *Salmonella spp* e *L. monocytogenes* aderidas, são reconhecidas como as mais resistentes aos sanitizantes (FRANK & KOFFI, 1990; KRYSINSKI et al., 1992; REN & FRANK 1993; RONNER & WONG, 1993; SINDE & CARBALLO, 2000).

Existem várias opções de sanitizantes no mercado, sendo que os princípios ativos mais utilizados são o ácido peracético, digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio e uma quarta alternativa com pouco uso seriam as misturas de ácidos orgânicos.

#### *2.1.1.1 Ácido Peracético*

O ácido peracético, também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético é obtido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com o peróxido de hidrogênio. Trata-se de um excelente sanitizante pela grande capacidade de oxidação dos componentes celulares dos micro-organismos, tendo uma rápida ação a baixas concentrações (0,0001% a 0,2%) sobre um amplo espectro de micro-organismos. É esporicida em baixas temperaturas e continua efetivo na presença de material orgânico sendo, portanto, um biocida efetivo sem residual tóxico. Sua ação biocida é influenciada pela concentração, temperatura e tipo de micro-organismos (NASCIMENTO, 2002).

É altamente compatível com o meio ambiente, pois é um composto biodegradável, podendo ser descartado com segurança. Porém deve ser manuseado sempre em local seco e ventilado e ser evitada a incidência de luz solar direta. É indicado o uso de equipamento de proteção individual (avental, luvas, protetor ocular ou facial e outros) durante o seu manuseio. A temperatura influencia significativamente a efetividade da sua ação germicida. Maior eficácia do ácido peracético é demonstrada a 25°C, enquanto o aumento da temperatura para 45°C provoca rápida decomposição do produto (ANDRADE & MACEDO, 1996).

O ácido peracético atua diretamente nas bases da molécula de DNA que são capazes de inativar a catalase, de uma enzima que pode interferir nos radicais

hidroxi, podendo ocorrer uma desnaturação de proteínas e enzimas dos micro-organismos (BLOCK, 1991).

No Brasil, a resolução nº 2586, de 10 de agosto de 2006 alterou o item “e” da Portaria nº 122/DTN, de 29 de novembro de 1993, que incluiu na portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988, subanexo um, alínea I, o princípio ativo do ácido peracético, para uso das formulações de desinfetantes/esterilizantes. Esta resolução foi publicada no Diário Oficial da União (D.O.U.) – Poder executivo, de 14 de agosto de 2006 (Brasil, 1993).

#### *2.1.1.2 Digluconato de clorexidina*

O Digluconato de clorexidina, também chamado simplesmente de clorexidina é uma substância química que foi introduzida há muitos anos como anti-séptico de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e negativas (DAVIES et al., 1954).

É uma biguandina com propriedades catiônicas. Quimicamente é classificada como Digluconato de Clorexidina, molécula estável que quando ingerida é excretada pelas vias normais, sendo que a pequena porcentagem retida no organismo não é tóxica. Quando em baixas concentrações, provoca lixiviação de substâncias de pequeno peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo efeito bacteriostático e bactericida em altas concentrações (DENTON, 1991).

O mecanismo de ação da clorexidina se caracteriza pela rápida absorção pelas células bacterianas, resultando em diversas modificações citológicas que afetam a permeabilidade e propriedades óticas. A quantidade do agente químico absorvida é proporcional a sua concentração, à densidade da célula bacteriana e à composição e pH do meio. Pesquisas revelam que a clorexidina reage com a célula a partir de grupamentos lipofóbicos, provocando uma desorientação de membrana lipoproteica, o que leva a uma alteração em sua função de barreira osmótica (ANDRADE & MACEDO, 1996).

#### *2.1.1.3 Ácidos Orgânicos*

O ácido ascórbico e seus vários sais neutros e outros derivados são os principais antioxidantes usados em frutos, hortaliças e seus sucos para prevenir o escurecimento e outras reações oxidativas. Além de ser totalmente seguro para o

consumo humano pode aumentar o teor de vitamina C de certos frutos e hortaliças (PRÉSTAMO & MANZANO, 1993; WILEY, 1994).

Os ácidos orgânicos têm sido amplamente utilizados principalmente no controle de *Salmonella* spp., embora exerça também um controle sobre outras bactérias. O modo de ação dos ácidos orgânicos (acético, fórmico e láctico) é atribuído a redução direta do pH intracelular por ionização dos ácidos não dissociados (BARBOSA & TORRES, 1999).

A ação inibidora dos ácidos orgânicos na forma não dissociada é de 100 a 600 vezes maior do que a forma dissociada. Os ácidos orgânicos não dissociados podem permear a membrana celular por difusão e liberar prótons no citoplasma da célula. O influxo de prótons induz a acidificação do citoplasma e dissipa o potencial de prótons da membrana (EKLUND, 1983). Isto inibe o mecanismo de transporte de substrato, geração de energia e a síntese de macromoléculas (DIEZ-GONZALES & RUSSEL, 1997).

Para Corlett Jr. e Brown (1980), citados por Silva et al. (2001), a ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos na higienização de carnes resulta de sua ação lipofílica, durante a qual os íons de hidrogênio penetram a membrana celular do microrganismo, acidificando o seu interior e inibindo o transporte de nutrientes. Para Adams (1999) a eficácia dos ácidos orgânicos puros ou combinados é o resultado da concentração, pKa e da capacidade de quelação dos ácidos. Segundo o autor os ácidos orgânicos têm sido considerados como responsáveis pela quebra no metabolismo de aminoácidos, síntese do DNA e metabolismo energético dos microrganismos. Os ácidos diminuem o pH intracelular e podem causar alteração na permeabilidade da membrana com o bloqueio do substrato do sistema de transporte de elétrons. Os ácidos lipofílicos fracos como láctico, acético ou propiônico são capazes de passar através da membrana celular de microrganismos em seu estado não dissociado e dissociam-se no interior da célula, produzem íons  $H^+$  que diminuem o pH da célula. As células reagem eliminando os prótons tentando manter o pH constante e esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior, reduzindo o crescimento celular microbiano. Por sua vez os ânions  $RCOO^-$  do ácido impedem a síntese de DNA fazendo com que a proteína não se replique (CHOCT, 2004).

#### *2.1.1.4 Hipoclorito de Sódio*

O hipoclorito de sódio apresenta uma série de vantagens comparativas em relação aos outros sanitizantes químicos: i) relativamente baratos; ii) ação rápida; iii) não afetados pela dureza da água; iv) efetivos contra uma grande variedade de microrganismos, inclusive esporos bacterianos e bacteriófagos; v) efetivos em baixas concentrações; vii) relativamente não tóxicos nas condições de uso; viii) soluções de fácil preparação e aplicação; ix) concentração facilmente determinada; x) usado em tratamento de água e xi) os equipamentos não necessitam ser enxaguados após a sanitização, se a concentração de uso for controlada adequadamente. Dentre as desvantagens do uso do hipoclorito de sódio encontram-se i) instabilidade ao armazenamento; ii) inativação pela matéria orgânica; iii) corrosão, se não usados corretamente; iv) irritação à pele; v) precipitação em água contendo ferro; vi) menor eficiência em pH mais elevado e vii) oxidação da borracha, que muitas vezes são componentes de equipamentos, por exemplo, gaxetas de pasteurizadores (ANDRADE et al, 2008).

Na indústria de alimentos, os compostos clorados podem ser utilizados para a sanitização de superfícies de paredes, pisos, tetos, equipamentos e utensílios, para a redução do número de microrganismos em carcaças bovinas, suínas e de aves, para a redução do número de microrganismos em frutas e vegetais minimamente processadas, para o controle microbiológico de água de resfriamento de alimentos enlatados esterilizados (WEI et al, 1995).

A ação antimicrobiana dos compostos clorados, à exceção do dióxido de cloro, está associada à liberação do ácido hipocloroso em solução aquosa. Essa forma não dissociada é cerca de 80 vezes mais bactericida do que a forma dissociada (MCDONNELL e RUSSELL, 1999). Uma vez que o modo exato de ação do ácido hipocloroso não é conhecido, o principal efeito sanitizante do cloro é causado pela atividade oxidativa. Em particular, ácidos nucleicos e proteínas são destruídos e resultam em mudanças irreversíveis e rompimento da síntese proteica do DNA (ASSELT e GIFFEL, 2005).

## 2.2 Bactérias

### 2.2.1 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bastonete curto, Gram positivo, anaeróbio facultativo não esporulado. É um microrganismo ambiental de ampla disseminação, psicrotrófico, capaz de crescer em temperaturas de refrigeração. A partir de 1981 foi comprovada sua transmissão pelos alimentos ao homem. A dose infectante é desconhecida, mas provavelmente baixa. Os surtos relatados são esporádicos, mas a mortalidade em geral é alta (DOYLE, 1989).

Embora as carnes frescas apresentem, geralmente, baixas contagens de *L. monocytogenes*, à medida que aumenta seu grau de processamento, aumenta o risco de contaminação (JAY, 1996).

Por esse motivo, diversos derivados cárneos têm sido envolvidos, tanto em surtos de listeriose, quanto em casos esporádicos da enfermidade (FARBER & PETERKIN, 1991; ROCOURT & COSSART, 1997).

De acordo com Jeong & Frank (1994), *L. monocytogenes* apresenta alta capacidade de colonização de superfícies e de formação de biofilmes, podendo estabelecer-se dentro de plantas de processamento de alimentos, aumentando, dessa forma, a probabilidade de contaminações cruzadas e ambientais.

Em trabalho de Silva (1996), verificou-se a presença de *Listeria* spp., inclusive de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de linguiças mistas do tipo fresco nos frigoríficos analisados. A presença destes microrganismos nas amostras analisadas, em especial no produto final, demonstra a necessidade de readequação nas práticas de limpeza e sanificação das plantas de processamento analisadas, bem como representa risco potencial de listeriose ao consumidor (SILVA et al., 2004).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria capaz de se desenvolver lentamente em temperaturas de refrigeração, mas é sensível a baixos valores de pH de alimentos ácidos (iogurte e algumas frutas) e ao calor, sendo facilmente destruída pelo cozimento convencional (TOMPKIN et al., 2001).

Multiplica-se em pH entre 5,0 e 9,0 com ótimo em pH 7,0 e 7,5. É termolábil, podendo ser destruída durante o cozimento. Temperaturas como as utilizadas para pasteurização de leite a 71,7°C por 15 segundos podem inativar este microrganismo (MÜLLER & WEBER, 1996).

Encontra-se amplamente distribuída no ambiente; ela se encontra em solos, água, águas residuais e vegetação em decomposição. Comum no intestino de humanos e animais domésticos (incluindo moscas), produtos agrícolas frescos, meio ambiente da área de processamento na indústria (TOMPKIN et al., 2001). Têm sido isolada de diferentes alimentos, tais como leite cru e pasteurizado, queijo, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, de origem marinha, e refeições preparadas. Estes isolamentos têm sido realizados não só em outros países como também no Brasil (FRANCO & LANDGRAF, 2003). De acordo com Franchin (2008), no Brasil, trabalhos indicam a presença de *Listeria monocytogenes* em camarões (10% - região sul), filé de peixe (29,1% - região sul), leite pasteurizado e ensacado (16,7% - região nordeste), produtos cárneos refrigerados (10% - região sudeste), e mortadelas (8% - região sudeste).

### 2.2.2 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* contém apenas uma espécie de importância médica, que é a *Escherichia coli*, sendo esta bactéria caracterizada como um bacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo e capaz de crescer até temperaturas de 44°C. Pode causar infecção do trato urinário, gastroenterites, meningite neonatal e sepse (MIMS et al., 1999).

*E. coli* foi inicialmente introduzida como indicador em 1892 na Austrália e em 1895 nos Estados Unidos. Foi usada para indicar a contaminação da água por matéria fecal e, conseqüentemente, alertar para a presença potencial de patógenos entéricos. Da água foram estendidos aos alimentos, sem uma avaliação muito criteriosa da validade dessa aplicação em diferentes produtos. Atualmente, a premissa de que altos números de *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias em alimentos estão correlacionados com contaminação fecal já não é válida, por uma série de razões: 1) Esses organismos não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, e podem ser encontrados em reservatórios ambientais; 2) São comuns nos ambientes de manufatura de alimentos, e podem tornar-se parte da microbiota residente, principalmente se as condições de limpeza são inadequadas; 3) Várias estirpes de *E. coli*, coliformes ou enterobactérias podem crescer em alimentos refrigerados (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

### 2.3 Inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão

*Listeria monocytogenes* tem sido considerado o mais importante patógeno transmitido por alimentos devido à alta taxa de morte em grupos de risco (THÉVENOT et al., 2005), e pela sua capacidade de sobreviver em condições adversas (VARABIOFF, 1992; INCZE, 1998; BOLTON & FRANK, 1999; BONNET & MONTVILLE, 2005).

*L. monocytogenes* é um patógeno mesofílico, mas com comportamento psicrotrófico. É extensamente distribuído na natureza e seu controle em alimentos é difícil devido à tolerância relativamente elevada às condições inibitórias quando comparado a outros micro-organismos patogênicos transmitidos por alimentos (FARBER & PETERKIN, 1991). Geralmente são encontrados no ambiente natural do processamento de produtos alimentares como um biofilme capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (MURIAMA, 1996). Tem sido isolado de solo, vegetação, ensilagens, efluentes domésticos e industriais, água e em plantas de indústrias de alimentos (McGLAUGHLIN, 1987), além de material fecal de mais de 40 espécies de mamíferos, e no mínimo 17 espécies de aves, incluindo frangos e patos (DONNELLY et al., 1992).

Muitos alimentos têm sido implicados em manifestações de listeriose, que incluem produtos crus e pasteurizados de leite e derivados, de carnes cruas e cozidos de diferentes animais e peixes e de vários alimentos vegetais (RYSER & MARTH, 1991). Entretanto, a contaminação de frango congelado e refrigerado é elevada em comparação com outros alimentos (PINI & GILBERT, 1993). Esta incidência elevada é alarmante e aumenta o risco de contaminação cruzada entre o alimento cru e cozido durante a preparação. É conseqüentemente importante planejar um programa de controle da qualidade para esta bactéria ao se processar produtos de frango (UYTTENDALE et al., 1997).

Os desinfetantes são utilizados pela indústria de alimentos como uma alternativa no processo de desinfecção da planta industrial. Entretanto, a maioria das indústrias alimentícias somente utiliza a concentração e tempo de exposição indicados pelo fornecedor do desinfetante, não possuindo as informações necessárias para poder alterar a concentração ou o tempo de exposição do

desinfetante visando corrigir situações específicas que comumente ocorrem numa planta industrial.

A taxa de morte na presença do calor constante é uma função exponencial. Consequentemente, quando o  $\log_{10}$  dos números dos sobreviventes são traçados em relação ao tempo, o comportamento é descrito por uma linha reta. O valor de D é definido amplamente como o tempo exigido para o número de bactérias viáveis para diminuir 1 unidade logarítmica (ou o negativo recíproco desta inclinação).

Este valor de D é usado então como um modelo para respostas além dos dados visando estimar o tempo exigido para a desinfecção ( $10^{-3}$ UFC.mL) ou a esterilização ( $10^{-6}$ UFC.mL) considerando-se as cinéticas de morte como de primeira ordem (STUMBO, 1948a,b; ABRAHAM et al., 1990). Além disso, os valores de D são sugeridos como indicadores rápidos da eficácia preservativa de um produto (ORTH, 1979; AKERS, 1984).

Existem três métodos para a determinação do valor de D da informação cinética de morte microbiana (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1985). O mais simples é o método de Stumbo ou de valor-limite que utiliza somente pontos iniciais e terminais do tempo. Neste método, uma quantidade conhecida de bactérias é exposta às condições de desinfecção para uma quantidade de tempo específico, e o número de sobreviventes é determinado. O valor de D é definido como a relação do tempo ao  $\log_{10}$  da redução em UFC por mililitro. O segundo método envolve calcular a média dos valores múltiplos do valor-limite D, um para cada amostragem, derivado no curso de uma experiência. O terceiro, utiliza a análise de regressão linear de pontos de dados múltiplos.

Todos os três destes métodos fornecerão valores similares para a taxa de morte quando as cinéticas são de primeira ordem. Se o relacionamento entre o  $\log_{10}$  do número de sobreviventes e o tempo não é linear, entretanto, resultarão em medidas muito diferentes. Estas diferenças terão um efeito direto na eficácia de um produto no mercado.

## **2.4 Adesão bacteriana**

A adesão microbiana ocorre em função da deposição de micro-organismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994; ZOTTOLA, 1997), o qual é reconhecido como o

primeiro passo no desenvolvimento de biofilmes (VALCARCE et al., 2002) e pode levar a uma variedade de problemas, como a corrosão de superfícies metálicas (BEECH & GAYLARDE, 1989) e a contaminação cruzada de alimentos processados (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000).

Todas as superfícies de processamento de alimentos são lugares potenciais para a adesão bacteriana, que podem ocorrer até mesmo quando programas de limpeza e sanitização são corretamente aplicados. Deste modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície (ROSSONI & GAYLARDE, 2000).

A eficiência dos processos de limpeza e sanitização de superfícies é reduzida pela presença de micro-organismos aderidos. Isto constitui um problema com o aumento do uso de procedimentos automáticos de limpeza e equipamentos complexos, que podem apresentar locais que facilitam o desenvolvimento de processos de adesão (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000).

Vários estudos mostram os fatores que influenciam a adesão bacteriana em superfícies envolvidas no processamento de alimentos. Dentre estes fatores incluem-se fase de crescimento da célula (STONE & ZOTTOLA, 1985), tipo e propriedades do material da superfície inerte (HAYES, 1993), presença de matéria orgânica (LEJEUNE, 2003), temperatura de incubação (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000) e pH do meio (HERALD & ZOTTOLA, 1988). Alguns autores citam outros fatores envolvidos com a adesão de bactérias como as características do micro-organismo, espécie, carga, hidrofobicidade, concentração, presença de apêndices superficiais, como *pili*, fímbrias, flagelo, cápsula; a síntese de substâncias exopoliméricas; as características do material aderente, como carga e microtopografia; e as características do meio que envolve o micro-organismo, tal como tempo de contato e turbulência (TROLLER, 1993; ZOTTOLA & SASAHARA, 1994; BOWER et al., 1996).

Czechowski (1990) constatou que as bactérias aderem quase que imediatamente as superfícies com as quais elas entram em contato, até mesmo em baixas temperaturas, como 5°C e 11°C. Entretanto, a consolidação e o subsequente aumento da população na superfície do biofilme são dependentes do tempo e o crescimento da maioria dos micro-organismos seria retardado a baixas temperaturas (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000).

A adesão bacteriana depende das propriedades físico-químicas do material do substrato e da superfície da célula. A possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e metais depende da composição química da superfície do metal e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE et al., 2002).

A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são forças físico-químicas envolvidas na aderência de micro-organismos às superfícies sólidas. A hidrofobicidade está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa do micro-organismo. Acredita-se que interações hidrofóbicas apresentem papel relevante na adesão de micro-organismos em superfícies inertes para processamento de alimentos e em superfícies de alimentos, a exemplo da carne. As superfícies com alta carga elétrica, como o vidro, suportam melhor o processo de adesão do que as superfícies com menor carga, como o poliestireno (DENYER et al., 1993).

Embora os mecanismos não sejam completamente entendidos, esses fatores físico-químicos têm um papel importante na aderência microbiana (HOOD & ZOTTOLA, 1995). Os micro-organismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, em função do modo de crescimento e das condições de cultivo (KUMAR & ANAND, 1998).

As células bacterianas e o substrato adquirem cargas superficiais geralmente negativas, como resultado da adsorção de íons ou de ionização de grupos de superfície. Essas cargas de superfície podem atrair íons com carga contrária, que estão na fase aquosa circundante. Assim, quando a bactéria está próxima da superfície do substrato, interações começam a se desenvolver, as quais são resultantes das cargas positivas e negativas que circundam as duas superfícies. A magnitude dessa força depende do potencial das duas superfícies, da força iônica e da constante dielétrica do meio circundante, além da distância entre a bactéria e o substrato (DENYER et al., 1993).

A temperatura e o pH também influenciam o mecanismo de adesão da bactéria. Stone & Zottola (1985) observaram que *Pseudomonas fragi* aderiu em superfície de aço inoxidável em escoamento contínuo de leite e produziu fímbria em 30 minutos a 25°C e em duas horas, a 4°C.

### **2.4.1 Técnicas para determinação da adesão bacteriana**

Há um aumento na demanda de novas tecnologias que fornecem uma rápida quantificação de micro-organismos. Muitos métodos vêm sendo avaliados, incluindo a microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo e bioluminescência. Apesar do uso de tais métodos há ainda algumas restrições como seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade e custo. Além disso, um desafio é atribuído à necessidade de quantificar bactérias aderidas em superfícies, particularmente quando estão na forma de biofilmes.

Vários métodos são usados para avaliar o processo de adesão. Dentre os vários tipos de microscopia utilizados, pode-se citar a microscopia ótica, a de epifluorescência, a de contraste de fase e eletrônica de varredura e de transmissão, sendo que a escolha do tipo de microscopia a ser utilizada dependerá do aspecto de formação do biofilme que se deseja analisar (ZOTTOLA, 1997).

As técnicas microscópicas são as mais recomendadas para a visualização da adesão bacteriana, crescimento e formação de biofilmes em sistemas de processamento de alimentos, podendo até acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real (PARIZZI, 1999).

A microscopia permite obter informações sobre a morfologia de células e colônias microbianas, distribuição destas colônias na superfície, presença de exopolissacarídeos e natureza dos produtos de corrosão se, por exemplo, são cristalinos ou amorfos. Ela também revela o tipo de ataque por meio de observações das mudanças na microestrutura do metal depois da remoção do biofilme (BEECH, 2004).

A microscopia de contraste de fase também é muito útil nos estudos de adesão microbiana em superfícies. Ela é particularmente recomendada quando se deseja acompanhar o desenvolvimento da formação do biofilme em tempo real, também em uma superfície transparente. Desde a sua primeira aplicação, há mais de vinte anos, a contagem de bactérias por microscopia de epifluorescência tornou-se uma técnica comumente usada para a estimativa de bactérias em diferentes estados fisiológicos, como dormente, injuriada, estressada, viável, mas não cultivável ou morta usando fluorocromos, ou seja, substâncias fluorescentes seletivas (BERNARDEAU, 2001).

Já as técnicas de microscopia eletrônica são as mais indicadas quando se deseja analisar a interação microbiana na matriz do biofilme. De modo geral, as

amostras são fixadas usando-se agentes químicos, por exemplo, o glutaraldeído, o paraformaldeído e o ósmio ou crio-fixadas, onde a amostra é rapidamente congelada para evitar os danos às células pelos cristais de gelo (ZOTTOLA, 1997). Dentre as técnicas de microscopia eletrônica incluem-se a de varredura (MEV) e a de transmissão (MET). Uma sequência típica de preparação da amostra a ser analisada pela MEV consiste no desenvolvimento de biofilme sobre um “suporte” sólido, como por exemplo, o vidro, o aço inoxidável, a borracha e seguido pela fixação da amostra, dessecação e cobertura com metal. Essas etapas influenciam na qualidade da imagem resultante. Para análises por MET, após desidratação e fixação, uma resina é infiltrada nas amostras, geralmente epóxi ou metacrilato, formando uma cobertura semelhante a um plástico enrijecido em que as amostras são cortadas em um ultramicrótomo, usando um diamante ou lâmina de vidro, numa espessura de aproximadamente 90 nm, que são colocados em grades de cobre, as quais compõem o MET. Geralmente estas grades são revestidas com um fino filme de polímero para auxiliar no suporte dos cortes. Urânio ou chumbo são os metais usados para corar os cortes ultrafinos, desse modo as grades são colocadas em uma coluna e os elétrons transmitidos através da amostra, que pode ser vista por fosforescência (ZOTTOLA, 1997).

A contagem padrão em placas é usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos e de superfícies que entram em contato direto com os mesmos, fornecendo também ideia sobre seu tempo útil de conservação (SILVA et al., 1997). Sua presença em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (SIQUEIRA, 1995).

O método de contagem padrão em placas baseia-se na premissa de que cada célula microbiana presente na amostra irá formar, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, uma colônia visível e isolada. Ao variar o tipo de meio de cultura e as condições de incubação é possível selecionar o gênero ou a espécie que se deseja contar. Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos, não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. A relação correta é feita entre o número de colônias e o número de unidades formadoras de colônias (UFC), que podem ser tanto

individuais como agrupamentos característicos de certos micro-organismos (SILVA et al., 1997).

## 2.5 Biofilmes bacterianos

O desenvolvimento de biofilmes microbianos ocorre frequentemente nas indústrias de alimentos, onde grande quantidade de nutrientes está disponível aos micro-organismos, como por exemplo, quando válvulas, gaxetas de borracha e as partes internas de tubulações de aço inoxidável são colonizadas por micro-organismos (BERESFORD et al., 2001; LEREBOUR et al., 2004). Nesses pontos, se não houver higienização completa, certamente haverá condições favoráveis ao crescimento de micro-organismos (ALLISON et al., 2000).

Os biofilmes são constituídos por bactérias que se aderem a superfícies e que são envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, ou seja, depósitos onde os micro-organismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica, conhecidos por glicocálix ou exopolissacarídeos. Os biofilmes contêm, além de micro-organismos, partículas de proteínas, lipídios, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, formando uma espécie de crosta, debaixo da qual os micro-organismos continuam a crescer, caracterizando um cultivo “puro” ou uma associação com outros micro-organismos (CRIADO et al., 1994).

Não há consenso a respeito do número de células que é necessário para formar os biofilmes. Ronner & Wong (1993) consideraram como biofilme um número  $3,0 \log \text{UFC/cm}^2$  de células aderidas por centímetro quadrado, enquanto Wirtanen et al. (1996) e Andrade et al. (1998) afirmaram ser necessária, além da produção de exopolissacarídeos, uma população de células de  $10^5$  e  $10^7$  células por centímetro quadrado, respectivamente, para que um biofilme possa ser considerado estável.

A formação de biofilmes, por outro lado, pode ser desejável para a indústria de alimentos e para outros fins. Em estações de tratamento de água ou de efluentes há remoção de organismos patogênicos e redução da quantidade de matéria orgânica na água ou efluentes através da interação com biofilmes. Para a indústria de alimentos, alguns exemplos podem ser citados, como a produção de vinagre, ácido cítrico e vinho, no qual as bactérias produtoras de ácido acético crescem em

biofilmes sobre camadas finas dos tonéis de madeira ou de concreto apresentando como função a conversão do substrato em produto final (SAKURAI et al., 1997).

A adesão e a formação de biofilmes microbianos podem ser indesejáveis, sob diversos aspectos na indústria de alimentos, uma vez que eles podem tornar menos eficiente o processo de cloração da água (BEER et al., 1994), reduzir a eficiência de transferência de calor em trocadores de calor (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994), reduzir o escoamento em tubulações (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994), desencadear processos corrosivos (BEECH, 2004) e, principalmente, tornarem-se fontes de contaminação microbiana (BEER et al., 1994). Sob o aspecto microbiológico, a adesão pode constituir-se de micro-organismos alteradores e, ou, patogênicos, que resultam em graves problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica (CRIADO et al., 1994).

Muitas bactérias, em seus *habitats* naturais, podem existir em duas formas diferentes: no estado planctônico, em que se apresentam de forma livre, e no estado sésil, em que estão aderidas a uma superfície (MARSHALL, 1992). O principal conceito do estudo de biofilmes é a diferença no estado fisiológico destas bactérias (LEJEUNE, 2003).

Estudos têm mostrado que a população no biofilme apresenta diferenças entre células planctônicas e células aderidas (LEJEUNE, 2003). Os biofilmes diferem em seu metabolismo, estrutura química, características de superfície da célula, resistência a agentes químicos e físicos comumente usados em procedimentos de higienização, entre outros (ALLISON et al., 2000). As células estão envolvidas em uma matriz polimérica e são diferentes fenotipicamente de quando crescem em suspensão. Uma das maiores diferenças é o aumento da resistência, na ordem de 10 vezes a 100 vezes, aos agentes antimicrobianos (DRUGGAN et al., 1993).

Os biofilmes são naturalmente heterogêneos e, por essa razão a quantificação da morfologia é o principal problema (MIDELET & CARPENTIER, 2004). Embora a função e a aparência de biofilmes em vários ambientes sejam diferentes, todos os biofilmes originam-se da mesma sequência de eventos (BOS et al, 1999; FORSYTHE, 2002).

Segundo estes autores, sua formação ocorre na seguinte sequência de eventos (Figura1:2.1):

i) Os nutrientes dos alimentos são adsorvidos na superfície formando um filme condicionante. Isso leva a uma alta concentração de nutrientes, comparada com a

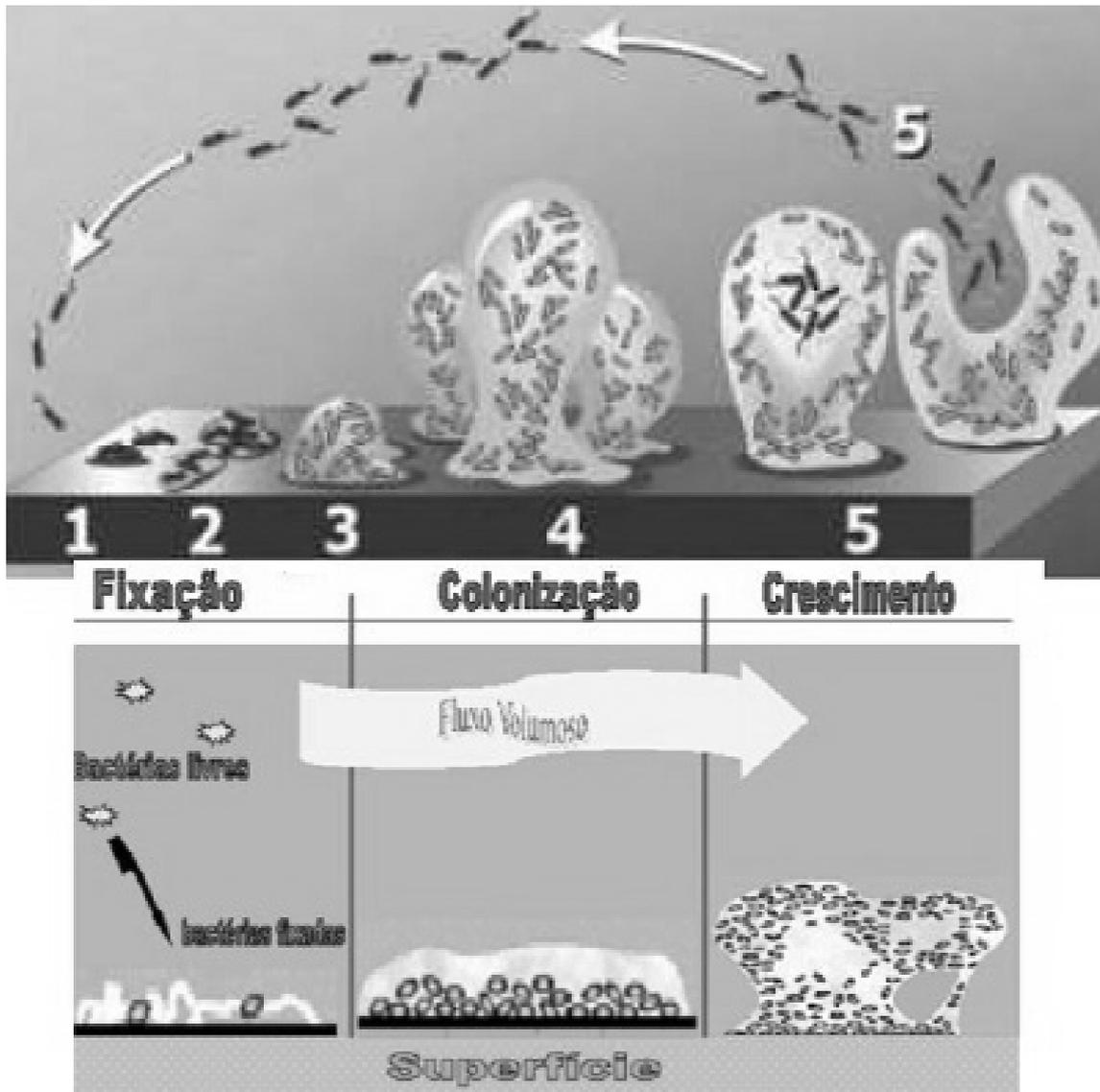
fase líquida, e favorece a formação de biofilmes. A camada de nutrientes afeta ainda as propriedades físico-químicas da superfície, como, por exemplo, a energia livre da superfície, as mudanças na hidrofobicidade e as cargas eletrostáticas, as quais influenciam e dão condições à colonização microbiana.

ii) Os micro-organismos aderem à superfície condicionante. A adesão inicial das bactérias por forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interação hidrofóbicas é reversível. Mais tarde, a adesão é irreversível devido às ligações mais fortes como interações dipolo-dipolo, ligações covalentes e iônicas e interações hidrofóbicas. Os flagelos bacterianos, as fímbrias e os exopolissacarídeos estão envolvidos no contato com filmes condicionantes. O exopolissacarídeo é importante na adesão célula-célula e célula-superfície e também protege as células contra a desidratação.

iii) As bactérias irreversivelmente aderidas crescem e dividem-se, formando micro colônias, as quais aumentam e depois se unem para formar uma camada de células que cobre a superfície. Durante essa fase, as células produzem polímeros adicionais que aumentam sua fixação e estabilizam a colônia contra flutuações do ambiente.

iv) A adesão contínua e o crescimento das células bacterianas, conjuntamente com a formação de exopolissacarídeos, levam a formação de biofilmes. A camada de biofilme pode ter vários milímetros de espessura em questão de dias.

v) Com o tempo, o biofilme começa a liberar partículas relativamente grandes de biomassa. As bactérias das partes liberadas podem contaminar o alimento, distribuindo-se de forma não homogênea no alimento ou iniciar a formação de um novo biofilme na linha de produção.



**Figura 1:2.1** – Etapas do desenvolvimento do biofilme. (KASNOWSKI, M.C. et al. , julho 2010)

No controle e na prevenção de biofilmes microbianos, a etapa de remoção de resíduos é fundamental. Um biofilme microbiano presente em uma superfície com resíduos oriundos do alimento impede uma efetiva penetração do sanitizante para inativar os micro-organismos. O sanitizante reage, também, com resíduos de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais. Assim, a atividade antimicrobiana sanitizante será prejudicada.

Sabe-se que quando o biofilme é tratado corretamente com detergentes, antes do uso de sanitizantes, a população de micro-organismos será reduzida. No entanto, procedimentos de higienização incorretos não removem e nem inativam os micro-organismos aderidos (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994). Tratamentos

mecânicos e a quebra química da matriz de polissacarídeos são necessários para a remoção de biofilmes (FORSYTHE, 2002).

As bactérias aderidas são cobertas com material orgânico o qual pode inibir a penetração do sanitizante em função da perda de propriedades umectantes. Portanto, a atividade de detergência é necessária para remover essa camada externa, antes da utilização de um sanitizante. Os micro-organismos mortos devem ser removidos, pois, do contrário, podem agir como um filme condicionante e como fonte de nutrientes para uma posterior formação de um novo biofilme. Novos agentes de limpeza e tratamentos enzimáticos são formulados para a remoção efetiva de biofilmes (FORSYTHE, 2002).

O desenho e o projeto dos equipamentos também são aspectos importantes para a prevenção e o controle de biofilmes. Um desenho adequado de equipamentos como tanques, dutos e juntas facilita a limpeza da linha de produção. A microtopografia da superfície pode complicar os procedimentos de limpeza quando fendas e outras imperfeições protegem as células aderidas. O aço inoxidável resiste aos danos de impacto, mas é vulnerável à corrosão, enquanto superfícies emborrachadas são propensas à deterioração e podem desenvolver rachaduras onde as bactérias podem se acumular (LE CLERCQ-PERLAT & LALANDE, 1994).

Muitos microorganismos estão envolvidos na adesão e formação de biofilmes, incluindo bactérias deterioradoras e patogênicas. Dentre as alteradoras encontram-se: *Pseudomonas aeruginosa* (HEYDOM et al., 2002), *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp. (CRIADO et al., 1994), *Pseudomonas fluorescens* (ROSSONI & GAYLARDE, 2000; VALCARCE et al., 2002), *Enterococcus faecium* (ANDRADE et al., 1998b) e *Shewanella putrefaciens* (HJELM et al., 2002). Entre as bactérias patogênicas incluem-se *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes* (LEJEUNE, 2003), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (POMPERMAYER & GAYLARD, 2000), *Vibrio parahaemolyticus* (WONG et al., 2002), *Klebsiella pneumoniae* (Di MARTINO et al., 2003) e *Escherichia coli* O157:H7 (DEWANTI & WONG, 1995).

Em um estudo realizado por Peters et al. (1999), vários patógenos foram isolados de comunidades de biofilmes. Neste estudo, *Listeria* spp. foi encontrada em 35% das superfícies de contato com alimentos e em 42% de fontes ambientais, com *Staphylococcus aureus* presente em um total de 7 e 8%, respectivamente. Joseph et

al. (2001), relataram a presença de bactérias, como *Klebsiella* spp., *Campylobacter* spp. e *E. coli* enterohemorrágica em biofilmes.

Segundo estudo conduzido por HOLAHA et al., (2002) em uma indústria de alimentos, estirpes microbianas, por exemplo, *E. coli* e *L. monocytogenes*, foram encontradas nas superfícies de trabalho e produtos, e algumas dessas cepas foram persistentes. As células estavam embebidas na matriz orgânica do biofilme, o qual mostra que a estrutura do biofilme formado afeta o modo pelo qual as superfícies devem ser limpas. Oulahal-Lagsir et al. (2003) constataram que o tratamento com enzima glicolítica e proteolítica associado com ultra-som aumenta a remoção de biofilme formado por *E. coli* em superfícies de aço inoxidável suja com leite.

Além de células vegetativas, os esporos bacterianos também podem participar dos processos de adesão às superfícies. Estes são de grande interesse, uma vez que são muito resistentes aos tratamentos térmicos, irradiação, desidratação, vácuo, congelamento e diversos agentes químicos (TORTORA et al., 2000).

## **2.6 Superfícies utilizadas no processamento de alimentos**

Todas as superfícies de processamento de alimentos são lugares potenciais para a adesão bacteriana, que podem ocorrer até mesmo quando programas de limpeza e sanitização são corretamente aplicados. Deste modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície (ROSSONI & GAYLARDE, 2000).

A Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997 do SVS/MS (BRASIL, 1997) aprova o “Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, definindo as condições técnicas para a utilização de materiais que compõem equipamentos e utensílios. De acordo com esta Portaria, todo o equipamento e utensílio utilizado nos locais de manipulação de alimentos que possam entrar em contato com o alimento devem ser confeccionados de material que: I) não libere substâncias tóxicas, odores e sabores; II) seja não absorvente e resistente à corrosão; III) seja capaz de resistir a repetidas operações de limpeza e desinfecção.

As superfícies devem ser lisas e estarem isentas de rugosidade e frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higiene dos alimentos. Não é recomendável o uso de madeira e de outros materiais que não possam ser limpos e desinfetados adequadamente, a menos que se tenha a certeza de que seu uso não será uma fonte de contaminação. Deve ser evitado o uso de diferentes materiais na mesma superfície para inibir o aparecimento de corrosão por contato (BRASIL,1997). As características das superfícies auxiliam a realização de um procedimento de higienização adequado (HAYES, 1993). Superfícies utilizadas em indústrias e que entram em contato com os alimentos apresentam diferentes microtopografias de superfície, podendo apresentar fissuras ou microfissuras ou fendas com tamanho suficientes para alojar micro-organismos, principalmente bactérias. A ocorrência destas imperfeições origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização que favorece o crescimento microbiano e o desenvolvimento de micro-organismos (BOWER et al., 1996). A rugosidade dos materiais também influencia na formação do biofilme (TAYLOR & HOLAH, 1996), mas parece ser menos importante em relação à adesão inicial (BOULANGE-PETERMANN et al., 1998). Esse fato pode ser relacionado à superfície de contato entre micro-organismos e superfícies que processa o alimento. Em geral, quanto maior a superfície de contato maior a probabilidade de formação de biofilme, uma vez que maior é a força inicial de adesão. Contudo, nem sempre quanto maior a rugosidade maior será a adesão inicial. A influência da rugosidade da superfície no processo de formação de biofilme é relacionada às dificuldades durante higienização de superfícies rugosas.

Equipamentos processadores de alimentos são fontes potenciais de micro-organismos patogênicos (MIDELET & CARPENTIER, 2004). Haeghebaert et al., (2002) constataram que a contaminação de equipamentos contribuiu com 59% dos surtos de doenças de origem alimentar investigadas na França durante o ano de 2001. Consequentemente é importante melhorar o conhecimento dos fatores envolvidos na transferência de micro-organismos de equipamentos para os alimentos, especialmente durante o contato.

A facilidade de higienização de superfícies, além de suas propriedades anticorrosivas e mecânicas, tem sido um dos argumentos decisivos na escolha de materiais para equipamentos da linha de processamento (JULLIEN et al., 2002).

Os materiais das superfícies comumente usados no processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro, permitem o crescimento microbiano, que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes (RODOLFO Jr. et al., 2002; LEJEUNE, 2003).

As superfícies lisas, duras, contínuas sem fendas ou fissuras são as mais indicadas. As características macroscópicas e particularmente microscópicas das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos com micro-organismos deterioradores ou patogênicos. As características das superfícies auxiliam na realização de um procedimento de higienização adequado, sendo que quanto mais lisa a superfície, mais fácil será a higienização. O ideal é que nas superfícies não se formem poros nem ranhuras, e que estas sejam resistentes às deformações, como o abaulamento. (ANDRADE et al., 2008).

Dentre os materiais disponíveis, o aço inoxidável, uma liga cuja composição inclui carbono, cromo e níquel, é o mais utilizado. Há diversos tipos de aço inoxidável, mas os que contêm 18% de cromo e 8% de níquel são os mais usados. Neste grupo, estão as ligas da classe 300, por exemplo, 304 e 316, que são resistentes à corrosão causada pela maioria dos alimentos, detergentes e sanitizantes, além de serem facilmente higienizáveis e relativamente baratas. Esta superfície é comumente usada na construção de equipamentos e utensílios de processamento de alimentos em geral, como: tanques de fabricação e estocagem, trocadores de calor, silos, tachos, tubulações, mesas, pias, bancadas para manuseio, entre outras aplicações (JULLIEN et al., 2002).

Superfícies de aço inoxidável e vidro são de mais fácil limpeza do que polímeros, alumínio e cobre (BOULANGE-PETERMANN, 1996). Ainda segundo este autor, este material é relativamente mais resistente ao ataque de agentes oxidantes e outros agentes sanitizantes usados na indústria de alimentos, como hipoclorito de sódio, ácido peracético e iodóforos. Entretanto, a microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, que permitem a proteção das células bacterianas contra as forças exercidas pelo escoamento do alimento (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994).

As propriedades dos polímeros variam bastante, de acordo com a matéria-prima utilizada, dos aditivos incorporados e do método de fabricação. Aqueles

usados na indústria de alimentos são agrupados em duas categorias: termoplásticos e termoestáveis. Os termoplásticos amolecem quando são aquecidos e endurecem quando resfriados, processo que pode ser repetido várias vezes sem mudanças químicas apreciáveis. Os termoplásticos mais comumente encontrados em indústrias de alimentos são: polietileno, polipropileno, poli (cloreto de vinila) ou PVC, acrílico, entre outros. Os termoestáveis são capazes de endurecer na primeira vez que são aquecidos, mas se forem reaquecidos pode ocorrer degradação química. Poliéster, resinas epóxi e poliuretanos são polímeros termoestáveis usados como componentes de equipamentos usados no processamento de alimentos (HAYES, 1993; RODOLFO Jr. et al., 2002).

### 3. ARTIGO 1

## COMPARAÇÃO ENTRE CURVAS CINÉTICAS DE LETALIDADE E MODELOS PREDITIVOS DE VALOR-F PARA *Listeria monocytogenes* UTILIZANDO DIFERENTES SANITIZANTES

### 3.1 Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* utilizando ácido peracético, clorexidina e ácidos orgânicos como agentes ativos, determinando os respectivos valores D, Z e F. Baixos valores D foram obtidos para o ácido peracético e clorexidina, em comparação com os ácidos orgânicos. Para reduzir 6 log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes*, utilizando ácido peracético nas concentrações de 0,2%, 0,1%, e 0,05% são necessários 7,08min , 31,08min e 130,44 min de contacto, respectivamente. Os modelos matemáticos de valores F mostraram que em concentrações abaixo de 0,15% pode-se verificar um aumento exponencial nos valores F, tanto de clorexidina como ácido peracético. Os ácidos orgânicos apresentaram um comportamento linear, mostrando ligeira variação nos valores de F, mesmo nas concentrações menores. Os resultados obtidos são de fundamental importância em termos de estratégia industrial para o processo de sanitização, permitindo escolher o melhor produto usando a relação de concentração/tempo de exposição, visando à redução de custos, sem comprometer a eficiência do desinfetante.

### 3.2 Aplicações Práticas

Os resultados obtidos no presente trabalho são de importância industrial e não está disponível na literatura atual, principalmente para os ácidos orgânicos. Os resultados obtidos são de importância fundamental em termos de estratégia industrial para o procedimento de sanitização, permitindo-se escolher o melhor produto usando a relação de concentração/tempo de exposição, visando à redução de custos, sem comprometer a eficiência do desinfetante.

### 3.3 Introdução

*Listeria monocytogenes* tem sido considerado o micro-organismo patogênico mais importante transmitida por alimentos devido à elevada taxa de mortalidade em grupos de risco (Thévenot et al., 2005), e sua capacidade de sobreviver em condições adversas (Varabioff, 1992; Incze, 1998; Bolton e Frank, 1999; Bonnet e Montville, 2005). Geralmente, estes micro-organismos são encontrados no ambiente natural de processamento de alimentos como um biofilme capaz de se reproduzir a temperaturas de frigorífico (Muriama, 1996; Ibusquiza et al., 2011). Estes micro-organismos já foram isolados do solo, vegetação, resíduos domésticos e industriais, água e indústrias alimentares (McGlaughlin, 1987; Kastbjerg e Gram, 2009).

Ácido peracético e clorexidina têm sido amplamente utilizados em indústrias de alimentos devido ao seu efeito sob diferentes micro-organismos (Frank et al., 2003; González-fandos et al., 2005; Pan et al., 2006; Aarnisalo et al., 2007). Os ácidos orgânicos têm sido usados diretamente nos alimentos para controle de *Salmonella* spp., além de apresentar efeito sobre outras bactérias. Seu uso como desinfetante em escala industrial é recente (Beltrame et al., 2012).

Indústrias de alimentos devem ter limites de segurança para serem seguidos por um sistema de monitoramento com o objetivo de assegurar que a meta estabelecida seja atingida. Algumas estratégias podem ser citadas, principalmente o controle da concentração de princípios ativos das soluções de higienização e determinação da qualidade microbiológica requerida como critério técnico para superfícies higienizadas, sala de processamento, equipamentos e manipuladores (Andrade et al., de 2008).

A eficiência das soluções desinfectantes pode ser determinada em termos de valor D (Mazzola et al., 2003). A taxa de mortalidade, na presença de calor constante, é uma função exponencial. Por conseguinte, quando o número de sobreviventes  $\log_{10}$  são traçadas como uma função do tempo, o comportamento é descrito como uma linha. O valor de D é definido como o tempo necessário para reduzir uma unidade logarítmica de bactérias viáveis.

O valor de D é usado como um modelo para respostas visando estimar o tempo exigido para a desinfecção ( $10^{-3}$  UFC/mL) ou a esterilização ( $10^{-6}$  UFC/mL) considerando as cinéticas de morte como de primeira ordem (Stumbo, 1948ab; Abraham et al., 1990). Além disso, os valores de D são sugeridos como indicadores rápidos da eficácia preservativa de um produto (Orth, 1979; Akers, 1984).

Com base nestes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de inativação de *L. monocytogenes* em suspensão utilizando ácido peracético, clorexidina e ácidos orgânicos como agente ativo, determinando os respectivos valores D, Z e F.

### 3.4 Material e Métodos

As curvas cinéticas de letalidade de *L. monocytogenes* em diferentes tempos de contato e diferentes concentrações de sanitizantes (clorexidina, ácido peracético e ácidos orgânicos) foram obtidas para determinar os respectivos valores D, permitindo calcular o valor Z e os diferentes valores F.

A cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) foi mantida em meio Luria Bentani (triptona 10,0 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5,0 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 5,0 g.L<sup>-1</sup>) a 4°C, foi cultivada para preparo do inóculo em meio padrão para contagem (triptona 5,0 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 2,5 g.L<sup>-1</sup>, e dextrose 1,0 g.L<sup>-1</sup>) a 35°C por 24 horas.

A partir do inóculo foram preparadas diluições em água destilada (10<sup>0</sup> a 10<sup>-8</sup>) e em cada réplica de diluição foi adicionada uma diferente concentração de ácido peracético (20% de princípio ativo), a clorexidina (15% de princípio ativo) ácidos orgânicos (ou mistura de 1,0% de ácido ascórbico, ácido cítrico a 0,475%, e 0,475% de ácido láctico) (0,2, 0,1, e 0,05 % v / v, respectivamente) foram adicionados e mantidos a 25 °C. Estas diluições foram inoculadas em meio agar padrão de contagem (agar 10 g.L<sup>-1</sup>, triptona 5 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 2,5 g.L<sup>-1</sup>, e dextrose 1,0 g.L<sup>-1</sup>) após permanecer por diferentes tempos de exposição ao desinfetante (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 12,5; 15; 18 e 20 minutos) e incubados a 35°C por 24 horas.

Diluições sem o desinfetante também foram inoculadas em agar padrão de contagem e incubadas a 35°C por 24 horas para determinar o número inicial de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

As contagens foram realizadas nas placas oriundas das diluições com um número inferior a 350 colônias em cada um dos tempos de exposição ao desinfetante. Todas as determinações foram feitas em duplicata e os resultados expressos como valor médio.

O modelo matemático para determinar o tempo de redução decimal (valor-D) de *L. monocytogenes* em uma concentração fixa do desinfetante foi baseado em um

balanço diferencial de primeira ordem (baseado em similaridades com processos de tratamento térmico):

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (1)$$

Onde N é o número de UFC, t é tempo de processo, k é a constante de proporcionalidade.

Integrando-se a Equação (1) com a seguinte condição inicial  $N(t=0) = N_0$ , onde  $N_0$  é o número de UFC inicial, tem-se;

$$\ln N - \ln N_0 = -kt \quad (2)$$

Rearranjando a Equação (2) em termos de log tem-se;

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{1}{D}t \quad (3)$$

onde,  $k = 1/D$  e D definido como a constante de redução decimal, a qual representa o tempo necessário para haver a ocorrência de 1 (um) ciclo log no processo.

Para a obtenção do valor D, foi realizada a regressão linear entre os diferentes tempos de exposição do micro-organismo ao desinfetante e o log de UFC sobreviventes, sendo D o inverso do coeficiente angular da reta ajustada.

A constante de resistência de morte de *L. monocytogenes* aos desinfetantes (valor-Z) foi determinada pela seguinte equação:

$$\log\left(\frac{D_1}{D_2}\right) = \frac{1}{Z}(C_1 - C_2) \quad (4)$$

Onde  $D_1$  e  $D_2$  são valores de redução decimal obtidos para as concentrações  $C_1$  e  $C_2$ , respectivamente. A constante Z representa a alteração de concentração necessária para que ocorra uma alteração de um ciclo log (90% de redução) no tempo de morte ocasionado pelo desinfetante.

Para a obtenção do valor Z, foi realizada a regressão linear entre as diferentes concentrações do desinfetante (C) e o log do respectivo valor D, sendo Z obtido a partir do inverso do coeficiente angular da reta ajustada.

É interessante salientar que a Equação (4) é de fundamental importância e utilidade em projetos, simulações e aplicações industriais do produto em foco neste trabalho. A partir do conhecimento da constante Z e dos valores de  $D_1$  em uma concentração  $C_1$  pode-se determinar o valor da concentração de aplicação do produto.

### 3.5 Resultados e Discussão

A regressão linear para o  $\log_{10}$  de UFC de *L. monocytogenes* e do tempo de exposição ao ácido peracético, clorexidina e ácidos orgânicos de 0,2, 0,1, e 0,05 % permitiu determinar os valores D, apresentados na Tabela 1:3.1. Baixos valores de D foram obtidos para o ácido peracético e clorexidina em comparação com os ácidos orgânicos (1,18; 1,38 e 6,45 min, respectivamente).

**Tabela 1:3.1** Valores D experimentais e modelos preditivos para ácido peracético, clorexidina e ácidos orgânicos para diferentes concentrações.

Sanitizante	Concentração (%)	Valor D (min)	Modelo Preditivo <sup>1</sup>
Ácido Peracético (Valor Z = - 0.121)	0,2	1,18	$y = -8,148x + 1,658$
	0,1	5,18	$R^2 = 0,967$
	0,05	21,74	
Clorexidina (Valor Z = -0.279)	0,2	1,38	$y = -5,938 + 1,266$
	0,1	3,09	$R^2 = 0,887$
	0,05	12,35	
Ácidos Orgânicos Valor Z = -3,646	0,2	6,45	$y = -1,314x + 1,07$
	0,1	8,51	$R^2 = 0,994$
	0,05	10,23	

<sup>1</sup> A letra y representa o valor D e a letra x representa a concentração do sanitizante.

Mazzola et al. (2003) realizaram a determinação do tempo de redução decimal (valor-D) com clorexidina para diferentes bactérias. As cepas vegetativas que mostraram a maior resistência à solução de 0,4% clorexidina foram *Enterococcus cloacae* (D = 8,3 min) e *Staphylococcus aureus* (D = 5,9 min). As mais

sensíveis foram *Acinetobacter calcoaceticus* (D = 4,1 min), *Serratia marcescens* (D = 4,0 min) e *Escherichia coli* (D = 3,0 min). Tempos de exposição de 3 a 4 minutos foram suficientes para reduzir 90% da população de *E. coli*, *S. marcescens* e *A. calcoaceticus*. Esporos expostos a 2% de clorexidina mostraram valores D próximos entre si com D = 9,1 min para *Bacillus stearothermophilus* e D = 6,7 min para *Bacillus subtilis*. Os mesmos autores verificaram que as bactérias que apresentam maior resistência a uma solução de 1% Minncare (0,45 % de ácido peracético, mais 2,2% de peróxido de hidrogénio) foram *B. stearothermophilus* (D = 9,1 min), de *E. coli* (D = 6,7 min), e de *B. subtilis* (D = 5,9 min). As cepas mais sensíveis com resistência similar foram *A. calcoaceticus* (D = 3,4 min), *E. cloacae* (D = 3,5 min), e *S. aureus* (D = 3,6 min) .

Leaper (1984) avaliou a ação do ácido peracético em esporos de *B. subtilis* e obteve valores D de 0,6; 0,9; 3,2 e 25,1 min para concentrações de 0,20; 0,16; 0,12 e 0,08%, respectivamente.

A regressão linear entre os diferentes valores D obtidos para *L. monocytogenes* em relação a ácido peracético, clorexidina e de ácidos orgânicos mostrou linearidade, resultando em um valor de Z -0,121, - 0,279 e - 3,646, respectivamente.

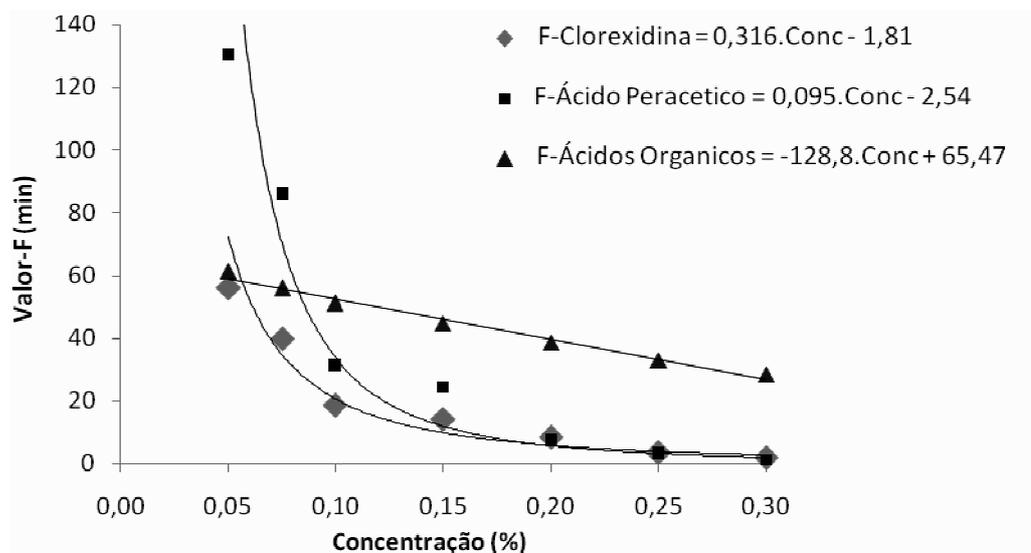
Considerando-se a aplicação destes resultados em uma planta industrial com uma contagem de  $1 \times 10^{-3}$  UFC/cm<sup>2</sup>, para uma desinfecção eficiente (Stumbo 1948 a,b; Abraham et al 1990), pode-se calcular o tempo de contato necessário para alcançar o resultado desejado (valor F). Assim, para a redução de 6 log<sub>10</sub> de *L. monocytogenes*, utilizando ácido peracético com concentrações de 0,2; 0,1 e 0,05 % são necessários 7,08; 31,08 e 130,44 min de contacto (valores de F), respectivamente. Sob as mesmas condições, obteve-se os valores de F de 8,28; 18,52 e 55,87min para a clorexidina e 30,54; 32,58 e 33,6min para os ácidos orgânicos.

Mazzola et al. (2003) obtiveram valores F de 9 a 12 min, para redução da 3 log<sub>10</sub> para *E. coli*, *S. marcescens* e *A. calcoaceticus*, usando 0,4% de clorexidina.

Beltrame et al. (2012) avaliaram diferentes sanitizantes e observaram que o ácido peracético foi eficiente a 10°C para todos os micro-organismos testados (*Salmonella choleraesuis*, *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*), utilizando a concentração de 0,2%, durante 2 min. A clorexidina apresentou eficiência em 2 min de contato para a *E. coli*, 18 min para *S. aureus* e *L. monocytogenes* com

concentração de 0,2%, mas para *S. Choleraesuis* foi necessário uma concentração de 0,5 % e 18 min de contato. Os ácidos orgânicos foram eficientes após 15 min de exposição (0,2% para *L. monocytogenes* e 0,6 % para *E. coli* e *S. choleraesuis*), porém não apresentaram eficiência para *S. aureus* nas concentrações e tempo de exposição avaliados.

A análise dos valores de F foi obtida pelos modelos matemáticos de cada sanitizante diferente (Fig. 2:3.1) pode-se observar que tanto a clorexidina quanto o ácido peracético mostraram alta eficiência em concentrações acima de 0,15%, em comparação com a utilização de ácidos orgânicos. Para concentrações inferiores 0,15%, pode-se verificar um aumento exponencial nos valores F, para clorexidina e ácido peracético. Os ácidos orgânicos apresentaram um comportamento linear, mostrando ligeira variação nos valores de F.



**Figura 2:3.1-** Valores de F e modelos matemáticos obtidos para a redução microbiana de  $1 \cdot 10^3$  para  $1 \cdot 10^{-3}$  UFC/cm<sup>2</sup> (desinfecção) com valores D obtidos pelos modelos preditivos de cada sanitizante diferente.

A redução da concentração do ácido peracético e de clorexidina de 0,2% a 0,05% conduz a um aumento de 18,4 e 6,7 vezes no tempo de exposição necessário para reduzir a contagem de *L. monocytogenes* de  $1 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $1 \times 10^{-3}$  UFC/cm<sup>2</sup>. Para os ácidos orgânicos, a mesma redução na concentração resulta em um aumento de apenas 1,6 vezes no tempo de exposição.

Alguns trabalhos na literatura relatam uma taxa de morte não-linear para diferentes micro-organismos expostos a diferentes desinfetantes (Campbell e Dimmick de 1966; Turner, 1983; Sutton et al 1991), corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Modelos preditivos para avaliar o efeito de um desinfetante em um ambiente qualquer não estão disponíveis, sendo difícil a execução de testes em condições práticas necessárias para determinar o efeito de cada um dos produtos. A escolha de um desinfetante que garanta a segurança de um processo é altamente complexa em função do tipo de bactérias, fase metabólica, a biodiversidade do micro-organismo, a influência do material orgânico e as condições de processamento, tais como temperatura e pH (Asselt e Giffel 2005).

Os resultados obtidos aqui são de fundamental importância em termos de estratégia industrial para o desenvolvimento de procedimentos de higienização, permitindo a escolha de um produto melhor, considerando a relação de concentração/tempo de exposição, visando à redução de custos, sem comprometer a eficiência desinfetante.

### 3.6 Referências Bibliográficas

- Aarnisalo, K., J. Lunde'n, H. Korkeala, and G. Wirtanen. 2007. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *Food Sci. Technol.* 40:1041–1048.
- Abraham, G., E. Debray, Y. Candau, and G. Piar. 1990. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3073–3080.
- Akers, M. J., A. V. Boand, and D. A. Binkley. 1984. Preformulation method for parenteral preservative efficacy evaluation. *J. Pharm. Sci.* 73:903–905.
- Andrade, N. J., C. L. O. Pinto, and M. S. Rosado. 2008. Controle da higienização na indústria de alimentos. Pp. 185–221 in N. J. Andrade, ed. *Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. Varela, São Paulo.
- Asselt, A. J., and M. C. Giffel. 2005. Pathogen resistance to sanitizers. Pp. 69–92 in H. L. M. Lelieveld, M. A. Mostert and J. Holah, eds. *Handbook of hygiene control in the food industry*. Woodhead Publishing Limited, England.
- Ball, C. O. 1920. Short-time pasteurization of milk. *Ind. Eng. Chem.* 35:71–85.
- Beltrame, C., G. B. Kubiak, L. A. Lerin, I. Rottava, A. J. Mossi, D. Oliveira, et al. 2012. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000046>.
- Bolton, L. F., and J. F. Frank. 1999. Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:350–353.
- Bonnet, M., and T. J. Montville. 2005. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:237–242.
- Campbell, J. E., and R. L. Dimmick. 1966. Effect of 3% hydrogen peroxide on the viability of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 91:925–929.
- Frank, J. F., J. Ehlers, and L. Wicker. 2003. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. *Food Prot. Trends* 23:654–663.
- González-Fandos, E., J. Sanz, M. C. García-Fernandez, and M. T. García-Arias. 2005. Effectiveness of disinfectants used in the food industry on microorganisms of sanitary interest. *Acta Aliment.* 34:253–258.
- Ibusquiza, P. S., J. J. R. Herrera, and M. L. Cabo. 2011. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 28:418–425.
- Incze, K. 1998. Dry fermented sausages. *Meat Sci.* 49:169–177.

- Kastbjerg, V. G., and L. Gram. 2009. Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed non persistent *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 106:1667–1681.
- Leaper, S. 1984. Influence of temperature on the synergistic sporicidal effect of peracetic acid plus hydrogen peroxide on *Bacillus subtilis* SA22 (NCA 72–52). Food Microbiol. 1:199–203.
- Mazzola, P. G., A. M. S. Martins, and T. C. V. Penna. 2003. Determination of decimal reduction (D-value) of chemical agents used in hospital disinfection. Braz. J. Microbiol. 34:33–34.
- McGlaughlin, J. 1987. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J. Appl. Bacteriol. 63:1–11.
- Muriama, P. M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. J. Food Prot. 59:54–63.
- Orth, D. S. 1979. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. J. Soc. Cosm. Chem. 30:321–332.
- Pan, Y., F. Breidt Jr., and S. Kathariou. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. Appl. Environ. Microbiol. 72:7711–7717.
- Stumbo, C. R. 1948a. Bacteriological considerations relating to process evaluation. Food Technol. 2:115–132.
- Stumbo, C. R. 1948b. A technique for studying resistance of bacterial spores to temperatures in the higher range. Food Technol. 2:228–240.
- Sutton, S. V. W., T. Wrzosek, and D. W. Proud. 1991. Neutralization efficacy of Dey-Engley medium in testing of contact lens disinfecting solutions. J. Appl. Bacteriol. 70:351–354.
- Thévenot, D., M. L. Delignette-Muller, S. Christieans, and C. Vernozzy-Rozand. 2005. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. Int. J. Food Microbiol. 101:189–200.
- Turners, F. J. 1983. Hydrogen peroxide and other oxidant disinfectants. Pp. 240–250 in S. S. Block, ed. Disinfection, sterilization, and preservation. Lea & Feabiger, Philadelphia.
- Varabioff, Y. 1992. Incidence of *Listeria* in small goods. Lett. Appl. Microbiol. 14:167–169.

## 4. ARTIGO 2

### **ADESÃO DE *Escherichia coli* EM SUPERFÍCIES DE CORTE E REMOÇÃO COM DIFERENTES SANITIZANTES**

#### **4.1 Resumo**

O objetivo do trabalho foi verificar a adesão bacteriana e a possível formação de biofilmes em superfícies de corte de polietileno novas e usadas, impregnadas com *Escherichia coli*, e avaliar a sua remoção usando diferentes concentrações de sanitizantes (ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos). Os resultados mostram que o número de células aderidas aumentou com o tempo de contato para a superfície avaliada, tanto nas superfícies novas como nas usadas. Em superfícies de corte novas e usadas uma concentração de 0,5% de ácido peracético foi efetiva para eliminar *E. coli*, a concentração de 0,2% foi efetiva apenas nas superfícies novas. Hipoclorito de sódio removeu a adesão em superfícies novas e usadas com 0,5 e 2%, respectivamente. A clorexidina e os ácidos orgânicos mostraram efeitos similares com redução total da adesão empregando 0,8 e 2% em superfícies novas e usadas, respectivamente.

#### **4.2 Introdução**

A indústria alimentar e a indústria da higiene tem cada vez mais avançado e melhorado seus processos, porém o número crescente de doenças de origem alimentar têm aumentado consideravelmente em todo o mundo, o que está chamando a atenção do consumidor sobre a qualidade dos alimentos.

Atualmente, a segurança alimentar é uma preocupação para os consumidores e para a indústria alimentar, bem como para as agências responsáveis pela saúde pública. Além disso, outra questão importante para a indústria de alimentos é o estado de higiene de superfícies de equipamentos de alimentos que são fontes potenciais de micro-organismos deterioradores e patogênicos. Isto também pode interferir na vida de prateleira e na qualidade sensorial dos produtos alimentares. Para manter os ambientes de processamento de alimentos em condições sanitárias

adequadas, as superfícies e os equipamentos das plantas de processamento de alimentos devem ser higienizadas antes e após as operações de processamento (Beltrame et al , 2012a; Srey et al, 2013).

Quaisquer resíduos de alimentos deixados em superfícies de processamento de alimentos ou equipamentos podem fornecer um nicho no qual os micro-organismos podem crescer rapidamente. O crescimento de bactérias patogênicas, tais como a *E. coli* pode resultar em contaminação cruzada de superfícies de processamento de alimentos, tais como superfícies para cortar produtos alimentícios (Montville et al., 2012).

A adesão de bactérias em superfícies sólidas dá origem à formação de cultura de células especializadas, chamado biofilme. Na indústria de alimentos, boas práticas de fabricação, produção com higiene e procedimentos de limpeza e desinfecção regulares são muito importantes, uma vez que a segurança alimentar e a qualidade podem ser determinados pela eficácia dos agentes de desinfecção (Krolasik et al., 2010). As bactérias têm a capacidade de se prender a qualquer superfície, incluindo, vidro, aço inoxidável, polipropileno, borracha e madeira. Uma formação do biofilme pode ocorrer em quase todas as superfícies envolvidas no processamento de alimentos, desde uma superfície rugosa apresentando fissuras e rachas, que podem acomodar os micro-organismos, até aquelas consideradas mais suave (Chaturongkasumrit et al., 2011; Chen, 2003; DeQueiroz e Dia, 2007, Dourou et al., 2011; Flach et al, 2005). Em ambientes domésticos, as doenças de origem alimentar causadas por contaminação cruzada são uma questão importante (DeVere e Purchase, 2007). Uma vez ligada à superfície, em condições aceitáveis, as bactérias têm a capacidade de se multiplicar. A colonização das células resulta na produção de polissacarídeo extracelular, conduzindo muitas vezes a formação de um ecossistema microbiano chamado de biofilme (Ryu e Beuchat, 2005).

O aumento da idade do biofilme está associada com o aumento da resistência bacteriana (Marouani - Gadri et al., 2009). Biofilmes estabelecidos são difíceis de remover com a limpeza e desinfecção (Mosteller e Bishop, 1993). As células microbianas que estão ligadas a uma superfície são mais resistentes a desinfecção do que as células planctônicas, que são vulneráveis (Bower et al. , 1996). Para impedir a fixação bacteriana, é importante uma efetiva limpeza e sanitização da superfície antes do biofilme se estabelecer.

Escolher um sanitizante adequado é muito importante para se alcançar um resultado satisfatório em índices microbiológicos, mas isso requer o conhecimento sobre o problema a ser resolvido e também sobre a eficiência do sanitizante sobre os micro-organismos envolvidos. No entanto, os fornecedores indicam que eles podem ser usados para qualquer problema, porque quase todos afirmam que o seu produto é extremamente eficaz contra vários micro-organismos. Uma vasta gama de desinfetantes químicos está disponível para a indústria alimentar, tais como álcoois, aldeídos, biguanidas, fenóis, ácidos orgânicos, os agentes de libertação de halogéneo, peróxidos e compostos de amónio quaternário (QAC) (Beltrame et al , 2012; Beltrame et al., 2013; Brooks e Flint, 2008).

Numerosos pesquisadores examinaram as superfícies de contacto de processamento de alimentos, tais como o aço inoxidável (Andrade et al , 1998; . Cabeça et al., 2012; Frank , 2003; Krolasik et al , 2010; Rossoni e Gaylarde, 2000; Ryu e Beuchat, 2005) mas nenhuma investigação foi relatada na formação de biofilme sobre as superfícies de corte de plástico utilizados em de preparação de alimentos, tanto em cozinhas domésticas, como comerciais, como também em áreas industriais.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de quatro desinfetantes utilizados na indústria de alimentos ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos, contra *E. coli*. Para cada sanitizante testado, diferentes concentrações foram avaliadas durante 72h, determinando-se a contagem total em superfícies de corte de polietileno novas e usadas antes e depois da aplicação do sanitizante.

## **4.3 Material e Métodos**

### ***4.3.1 Superfície avaliada para a adesão bacteriana***

O material da superfície de processamento de alimentos avaliada neste estudo foi tábua de corte de polietileno novas e usadas de polietileno de alta densidade. As superfícies usadas tinham 3 meses de uso industrial. As superfícies foram cortadas e cubos de 1,0cm × 1,0cm, sendo limpas por escovagem empregando detergente líquido e água, e lavadas com água destilada. Em seguida, imersas em etanol a 70%, durante 1 h, para a remoção de gordura e novamente

lavadas com água destilada e secas ao ar. As superfícies foram expostas à luz ultravioleta 254 nm durante 1 h para desinfecção, tal como descrito por Parizzi (1999), antes da deposição de quaisquer culturas bacterianas.

#### **4.3.2 Adesão de *Escherichia coli* em superfícies de processamento de alimentos**

Para estudar a adesão foi utilizada uma cepa de *E. coli* (ATCC 25922), previamente crescida em caldo de Luria Bertani - LB (triptona 10,0 g L<sup>-1</sup>, extracto de levedura 5,0 g L<sup>-1</sup>, NaCl a 5,0 g L<sup>-1</sup>).

As superfícies limpas foram imersas, a temperatura ambiente, em frascos contendo 100 mL de caldo LB acrescido de um volume de suspensão de células bacterianas, de forma a obter-se uma contagem de 10<sup>3</sup> UFC/mL. As superfícies devidamente esterilizadas (3 cubos para cada tempo) foram imersas nesse erlenmeyer com auxílio de uma pinça esterilizada e, então, incubados a 37°C. As avaliações da quantidade de células aderidas por centímetro quadrado foram realizadas durante 72 horas (0,1; 1; 3; 6; 12; 24; 48; e 72h) de contato, em cada superfície. O tempo zero corresponde à análise realizada imediatamente após a imersão das superfícies no frasco contendo o meio de cultura e a suspensão bacteriana. As análises foram realizadas em triplicata.

Concluído o período de incubação, as superfícies foram retiradas da suspensão de bactérias em caldo LB com *E. coli*, com auxílio de uma pinça esterilizada e imersos separadamente em 10mL de água peptonada a 0,1% por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersas em tubos contendo 5 mL da mesma solução diluente e submetidas ao vórtex, durante 1 minuto para a remoção das células sésseis (Parizzi, 1999). As áreas de contato foram esfregadas para baixo 10 vezes exercendo uma pressão sobre a superfície de contato. Os microorganismos aderidos aos cotonetes foram transferidos para tubos contendo 10 mL de água de peptona a 0,1% (p / v) esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. O tubo foi agitado utilizando um vortex durante alguns segundos para libertar as bactérias do cotonete. Em seguida, 1 ml da solução foi cuidadosamente semeada em placas de agar LB, incubadas a 35-37 °C durante 24 horas, para contagem de colônias.

### **4.3.3 Eficiência de diferentes sanitizantes sobre *Escherichia coli* em superfícies de processamento de alimentos**

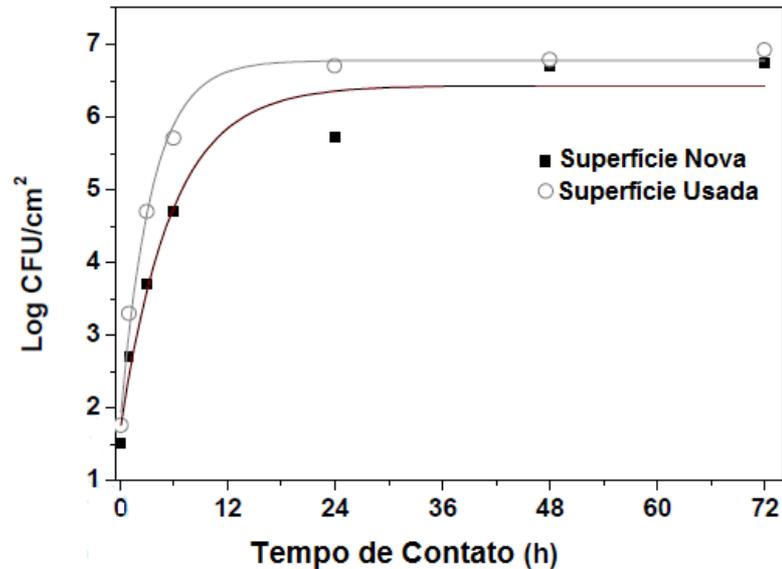
Os desinfetantes utilizados neste estudo foram escolhidos por representarem os mais utilizados na indústria alimentar. As superfícies aderidas com *E. coli* foram, então, submetidos a diferentes desinfetantes: ácido peracético 15% (Johnson Diversey, São Paulo -SP, Brasil), clorexidina 20% ( Neobrax, São Paulo- SP, Brasil), hipoclorito de sódio a 10 % (CSM Produtos Químicos Ltda, Chapecó - SC , Brasil) e ácidos orgânicos (formulada com 30% de ácido láctico, 3% de ácido cítrico, 3% de ácido ascórbico, e 7 % de sais de ácidos graxos em água (AD FOODS Indústria Produtos Alimentícios Ltda, Laguna - SC, Brasil). Para cada sanitizante, foram investigadas diferentes concentrações (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0 %) durante 10 minutos de exposição, para avaliar sua eficiência frente a adesão bacteriana. Estes agentes foram diluídos com água destilada esterilizada de acordo com as instruções do fornecedor.

A adesão bacteriana foi avaliada pela técnica da contagem padrão em placas (CPP), onde foram realizados swabs nas superfícies previamente sanitizadas. Os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup>. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em termos de valores médios.

## **4.4 Resultados e Discussão**

### **4.4.1 Adesão de *E. coli* em superfícies de processamento de alimentos**

A Figura 3:4.1 demonstra o crescimento de bactérias sem a presença de sanitizantes em 72 horas de contato em superfícies novas e usadas. Observou-se uma alta adesão pela contagem de *E. coli* em ambas as superfícies estudadas, tornando-se constantes após 24h nas superfícies usadas, enquanto nas superfícies novas estabilizou em 48 horas. Também foi observado que a adesão de bactérias em superfícies novas foi sempre menor do que sobre as superfícies usadas. Isto pode ser devido a hidrofobicidade e a rugosidade da superfície, porque, após a formação de biofilmes as superfícies tornam-se mais hidrófilicas ajudando o crescimento dos micro-organismos.



**Figura 3:4.1-** Quantificação de *E. coli* em placas de cortes novas e usadas sem a presença de sanitizantes.

A adesão das bactérias à superfície depende de parâmetros microbiológicos, físicos e químicos e parâmetros relativos ao material. A topografia da superfície tem sido amplamente estudada, pois os micro-organismos encontrados em fissuras ou fendas podem resistir a procedimentos de limpeza e desinfecção, e, subsequentemente, podem contaminar produtos alimentares ou recontaminá-los durante o processamento (Hilbert et al., 2003). Assim, as superfícies de processamento devem ser inerte, por outro lado, os componentes de desinfecção não devem ser tóxicos e não podem migrar ou ser absorvidos pelos alimentos. As superfícies que são lisas e sólidas, sem rachaduras ou fissuras são os mais adequados. Características macroscópicas e microscópicas de superfícies, em particular, são cruciais para a adesão microbiana, refletindo na contaminação de alimentos. Características de superfície são importantes para a realização de limpeza e procedimentos de higienização adequados, superfícies mais lisas são mais fácil de limpar (Andrade et al., 1998).

#### **4.4.2 Eficiência do ácido peracético na adesão de *Escherichia coli***

A Tabela 2:4.1 apresenta dados referentes à remoção de *E. coli* em superfícies de corte de polietileno, novas e usadas. Os resultados mostram que o

número de células aderidas aumentou com o tempo de contato para a superfície avaliada.

**Tabela 2:4.1-** Contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de células de *E. coli* aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de ácido peracético (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%).

Concentração de ácido Peracético (%)	Tempo de contato (h)						
	0,1	1	3	6	24	48	72
<b>Superfícies de corte novas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,52	2,70	3,70	4,70	5,72	6,70	6,75
0,2	0	0	0	0	1,30	1,70	1,90
0,5	0	0	0	0	0	0	0
0,8	0	0	0	0	0	0	0
2,0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Superfícies de corte usadas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,76	3,30	4,70	5,71	6,70	6,79	6,92
0,2	0	1,92	2,18	2,70	4,46	4,91	5,04
0,5	0	0	1,23	2,50	3,40	4,15	4,42
0,8	0	0	0	0	1,52	3,80	4,23
2,0	0	0	0	0	0	1,54	2,04

Nas superfícies de corte novas, as concentrações de ácido peracético indicadas pelo fornecedor, 0,5 % ou superior, foram completamente eficazes na remoção de *E. coli* em todos os tempos estudados, o que indica que esta concentração é suficiente. A concentração de ácido peracético de 0,2% foi eficaz na remoção de *E. coli* nas superfícies que permaneceram em contato com as bactérias por até 6 horas, e foi capaz de reduzir o número médio de células aderentes de 4,4 e 5,0 log nos tempos de tratamento de 48 e 72h, respectivamente e reduziu muito as contagens em tempos de adesão superiores.

Nas tabuas de corte de polietileno usadas, como esperado, verificou-se que o aumento na concentração de sanitizante provoca uma redução linear ( $R^2 = 0,80$  a  $0,86$ ) no Log UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli*, a partir de 24 horas de contato da bactéria com a superfície.

Considerando a concentração de ácido peracético recomendada pelo fabricante (0,8%), a partir de 24 horas observa-se que o mesmo não foi capaz de eliminar a adesão bacteriana completamente a superfície, configurando, desta forma, a possível formação de biofilme. A partir de 48 horas de contato, mesmo com concentração 2,5 vezes superior a recomendada (2,0%), o ácido peracético não se mostrou eficaz para eliminar todas as bactérias. Os resultados do presente estudo corroboram com os encontrados por outros pesquisadores (Adetunji e Isola, 2011; Fratamico et al, 1993), que observaram que a adesão *E. coli* aumentou com os níveis crescentes de organismos no inóculo e aumento do tempo de contato.

Em todas as superfícies de contato com alimentos é essencial eliminar fissuras e áreas mortas, pois o material orgânico pode se acumular levando a adesão bacteriana. A formação de biofilme pode ocorrer mesmo quando agentes de limpeza e sanitização são aplicados corretamente (Manijeh et al., 2008). Deste modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície (Rossoni e Gaylarde, 2000). Estudos têm mostrado que a população no biofilme apresenta diferenças entre células planctônicas e células aderidas (Lejeune, 2003). Os biofilmes diferem em seu metabolismo, estrutura química, características de superfície da célula, resistência a agentes químicos e físicos comumente usados em procedimentos de higienização, entre outros (Allison et al., 2000). As células estão envolvidas em uma matriz polimérica e são diferentes fenotipicamente de quando crescem em suspensão. Uma das maiores diferenças é o aumento da resistência, na ordem de 10 vezes a 100 vezes, aos agentes antimicrobianos (Druggan et al., 1993).

Miller et al. (1996) avaliaram o potencial da água em remover a *E. coli* 0157:H7 de 0 a 30 h, a 37 °C, para determinar o seu potencial de inibição em placas de corte de polietileno. Observou-se um aumento nas células bacterianas nas superfícies durante os primeiros 30 minutos de contato. Após 30 minutos de contato, foram verificados 2,4 log UFC/cm<sup>2</sup> nas superfícies de corte, aumentando o tempo de contato de 90 min a adesão não foi afetada significativamente ( $P > 0.05$ ). Comparando estes resultados com o nosso trabalho, é possível observar que, em ambas as superfícies novas e usadas, as mais baixas concentrações de ácido peracético usadas eram eficazes para a 3h de exposição.

#### **4.4.3 Eficiência de Clorexidina sobre a adesão de *Escherichia coli***

A Tabela 3:4.2 mostra a adesão de *E. coli* em superfícies de corte novas e usadas, durante 72 horas, empregando diferentes concentrações de clorexidina (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%). A concentração de 2% de clorexidina foi completamente eficaz na inativação da adesão das bactérias de *E. coli* em superfícies de cortes de polietileno novas durante as 72h avaliadas. Por outro lado, as menores concentrações estudadas não apresentaram inativação completa para a formação de biofilme. Nas tabuas usadas foi verificado crescimento microbiano em todas as concentrações após 3 h de contato.

Dessa forma, observa-se que a limpeza por meio da clorexidina foi mais eficiente em superfícies novas. A clorexidina é uma molécula catiónico com um amplo espectro antimicrobiano contra ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Mohammadi E Abbott, 2009). Este grupo de biguanidas difere de outros biocidas catiónicos que interagem apenas superficialmente com a bicamada lipídica alterando a fluidez por meio do deslocamento da ligação de um grupo na cabeça catiônica (Chawner e Gilbert, 1989). Em um estudo realizado por Houari e Di Martino (2007), os autores verificaram que a clorexidina foi capaz de inibir a formação de biofilmes de diferentes bactérias tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*, a concentrações convencionais de uso. Isto pode ser devido a concentrações mais elevadas, as interações são mais graves, causando perdas de integridade estrutural da membrana e permitindo a saída de materiais celulares.

**Tabela 3:4.2** - Contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de células aderidas de *E. coli* em placas de cortes novas e usadas, em 72 horas, com diferentes concentrações de clorexidina (0, 0.2, 0.5, 0.8 e 2 %)

Concentração de Clorexidina (%)	Tempo de Contato (h)						
	0.1	1	3	6	24	48	72
<b>Superfícies de Corte Novas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,40	2,74	3,68	4,73	5,90	6,67	6,89
0,2	1,34	2,34	3,40	4,60	5,62	6,17	6,73
0,5	1,17	1,30	2,14	3,48	4,32	5,04	5,70
0,8	0	0	1,40	1,96	3,70	4,54	4,56
2,0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Superfícies de Corte Usadas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,86	3,40	4,62	5,91	6,80	6,89	6,95
0,2	1,66	3,17	4,23	5,72	6,71	6,73	6,85
0,5	1,63	2,70	3,11	4,51	5,36	5,71	5,73
0,8	1,45	2,14	2,49	3,52	4,36	4,43	4,63
2,0	0	0	1,30	2,70	3,73	3,99	4,60

#### **4.4.4 Eficiência de ácidos orgânicos sobre a adesão de *Escherichia coli***

A Tabela 4:4.3 mostra a remoção de *E. coli* aderidas em placas de corte novas e usadas higienizadas com ácidos orgânicos. De acordo com os fornecedores, os ácidos orgânicos são sugeridos em uma concentração de 0,5%, nesta concentração verificou-se que foi eficiente na remoção de *E. coli* com 0,1 hora de contato em ambas as superfícies avaliadas. Concentrações altas de 0,8 e 2% foram eficazes na remoção de *E. coli* em 1 e 3 horas de contato nas superfícies de corte novas e usadas, respectivamente. A concentração de desinfetante de 2% foi eficaz por até 1h, e reduziu a contagem em 2,4 log durante 3 horas de contato nas superfícies de corte usadas. Os ácidos orgânicos atuam inibindo o metabolismo de aminoácidos, a síntese de DNA e no metabolismo de energia de micro-organismos. Os ácidos diminuem o pH intracelular e podem provocar uma alteração da permeabilidade da membrana, bloqueando o sistema de transporte de substrato, demonstrando assim a boa eficácia contra as bactérias. De acordo com Beltrame et

al., (2012b), a baixa eficiência de ácidos orgânicos pode ser explicada pelo fato de que os compostos estão numa forma dissociada no momento de aplicação do produto e dilui-se o purificador, de modo a dissociação superior conduz a uma eficiência mais baixa, este autor ainda afirma que o tempo de contato entre a superfície e a solução sanitizante deve ser superior a 15 minutos para termos um bom resultado utilizando-se ácidos orgânicos.

**Tabela 4:4.3** - Contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de células aderidas de *E. coli* em superfícies de cortes novas e usadas, durante 72 horas, com diferentes concentrações de ácidos orgânicos (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%).

Concentração de Ácidos Orgânicos (%)	Tempo de Contato (h)						
	0.1	1	3	6	24	48	72
<b>Placas Novas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
<b>0</b>	1,51	2,71	3,60	4,61	5,67	6,79	6,80
<b>0,2</b>	1,35	2,43	3,11	3,60	5,63	6,70	6,76
<b>0,5</b>	0	1,34	2,08	3,48	4,43	5,32	6,68
<b>0,8</b>	0	0	1,38	2,15	3,73	4,53	4,69
<b>2,0</b>	0	0	0	1,61	2,41	3,54	3,43
<b>Placas Usadas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
<b>0</b>	1,63	3,23	4,72	5,75	6,71	6,78	6,82
<b>0,2</b>	1,58	2,57	4,04	5,74	6,69	6,75	6,77
<b>0,5</b>	0	1,70	3,14	4,58	5,34	5,32	6,74
<b>0,8</b>	0	1,15	2,62	4,53	5,17	5,28	6,28
<b>2,0</b>	0	0	2,36	3,63	4,31	4,43	4,51

#### **4.4.5 Eficiência de hipoclorito de sódio sobre a adesão de *Escherichia coli***

A Tabela 5:4.4 mostra a eficiência do hipoclorito de sódio sobre *E. coli* aderidas em superfícies de corte. Utilizando-se uma concentração de 0,5%, indicada pelo fornecedor, observou-se que a mesma foi capaz de remover as células de bactérias, em todos os tempos de exposição avaliados, nas superfícies novas. Por outro lado, para se obter o mesmo efeito, sobre a superfície usada, foi necessária uma concentração de 2%. A concentração indicada pelo fornecedor de hipoclorito de

sódio é 0,5%, a qual apresentou uma redução de 0,90 e 1,08 log em 1 e 72 horas de contato sobre as superfícies de corte usadas, mostrando a possível formação de biofilmes sobre as superfícies em estudo. De acordo com Mosteller e Bishop (1993), o aumento da idade do biofilme está associada com o aumento da resistência bacteriana, portanto, é difícil remover estas células com a desinfecção.

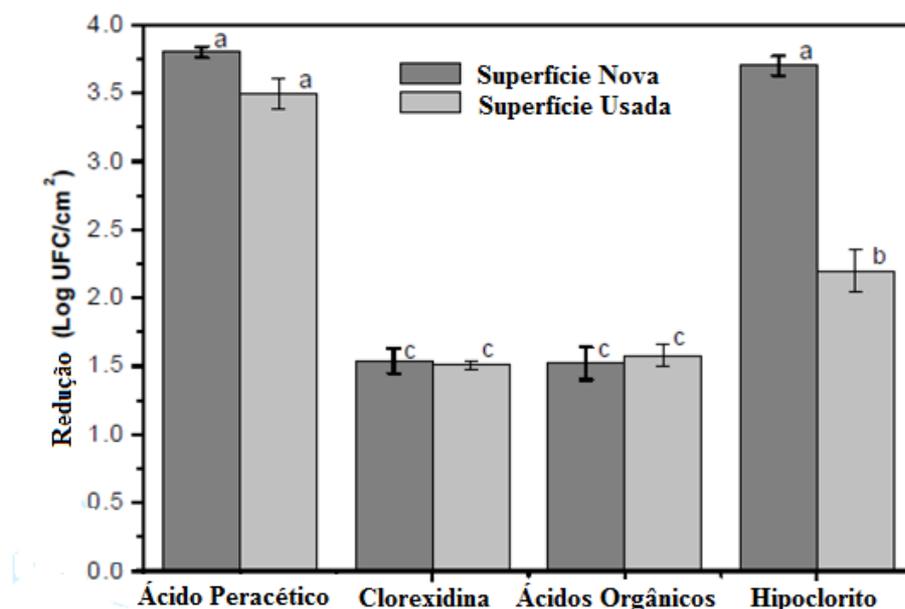
Outra indicação de contagens altas é a rugosidade da superfície e hidrofobicidade que podem afetar significativamente a fixação de um micro-organismo nas superfícies e adesão permanente. Movassagh et al., (2010), mostraram que a *E. coli* O<sub>111</sub> formou um biofilme com uma densidade celular média de 7,69 log UFC/cm<sup>2</sup> em superfícies de polietileno. Isso demonstra a dificuldade na remoção de células pela limpeza de rotina e os procedimentos de desinfecção utilizados em plantas de processamento de alimentos.

**Tabela 5:4.4** - Contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de células aderidas de *E. coli* em superfícies de corte novas e usadas, durante 72 horas, sanitizadas com diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%).

Concentração de Hipoclorito de Sódio (%)	Tempo de contato(h)						
	0.1	1	3	6	24	48	72
<b>Placas Novas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
<b>0</b>	1,51	2,71	3,58	4,22	5,58	5,97	6,56
<b>0.2</b>	0	0	0,22	1,71	2,26	2,92	3,12
<b>0.5</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>0.8</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>2.0</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>Placas Usadas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
<b>0</b>	1,67	3,38	4,61	4,70	5,52	6,73	6,82
<b>0.2</b>	1,58	2,69	3,08	3,69	3,96	6,25	6,57
<b>0.5</b>	0	2,48	2,67	3,30	3,58	4,43	5,74
<b>0.8</b>	0	1,97	2,06	2,28	2,65	2,82	3,05
<b>2.0</b>	0	0	0	0	0	0	0

#### 4.4.6 Avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos

Para comparar a eficiência da ação dos sanitizantes utilizados na indústria de alimentos, o ácido peracético, a clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos, foi avaliada a redução de Log UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli*, utilizando-se uma concentração de 0,5% por 3 horas de contacto com as superfícies de corte novas e usadas conforme apresentado na Figura 4:4.2. Estas condições de concentração e tempo foram escolhidas por representarem as condições mais comuns nas indústrias de alimentos, que utilizam superfícies de cortes.



**Figura 4:4.2** - Redução da contagem inicial da adesão de *E. coli* em superfícies de corte novas e usadas, durante 3h, sanitizadas com 0,5% de ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos.

Observou-se que o ácido peracético tem uma maior redução na contagem em relação à população inicial, em ambas as superfícies avaliadas, do que outros sanitizantes, exceto para o hipoclorito de sódio, em superfícies novas. A atividade sanitizante do ácido peracético é baseada na liberação de oxigênio ativo. Este composto interrompe a função quimiosmótica da membrana citoplasmática lipoprotéica e o transporte ou ruptura das paredes celulares. Também podem ser eficazes contra as lipoproteínas da membrana externa, facilitando a ação contra bactérias Gram-negativas. O ácido peracético intracelular pode também oxidar

enzimas essenciais. Assim, vias bioquímicas vitais, transportes através da membrana e os níveis intracelulares de soluto tornam-se danificados, causando alterações na molécula de DNA (Kitis, 2004).

Cabeça et al. (2012) realizaram um estudo de desinfecção em superfícies de aço inoxidável, utilizando ácido peracético e biguanida, e verificaram que estes foram capazes de reduzir os biofilmes de *E. coli* aderidas por 10 min em 2,2 e 2,1 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente, com uma concentração de 0,50% (v/v).

O hipoclorito de sódio mostrou uma redução semelhante ao ácido peracético em superfícies novas, mas menor capacidade em superfícies usadas, em 3 horas, com uma concentração de 0,5%. A menor capacidade do hipoclorito de sódio nas superfícies utilizadas pode ser explicada pela maior adesão das bactérias, o que aumenta a presença de matéria orgânica, o que inibe a ação do sanitizante. O hipoclorito de sódio, quando associado com a água forma ácido hipocloroso que contém cloro ativo, um agente oxidante forte. O Cloro exerce a sua ação antibacteriana por oxidação irreversível de um grupo sulfidrilo de enzimas essenciais para os micro-organismos, ocasionando a desativação das funções metabólicas da célula bacteriana (Rutala e Weber, 1997). O hipoclorito de sódio também pode ter um efeito prejudicial no DNA bacteriano, que envolvem a formação de derivados clorados de bases de nucleótídios. Além disso, tem sido relatado que o hipoclorito de sódio pode induzir a ruptura da membrana bacteriana (Mc Donnel e Russel, 1999).

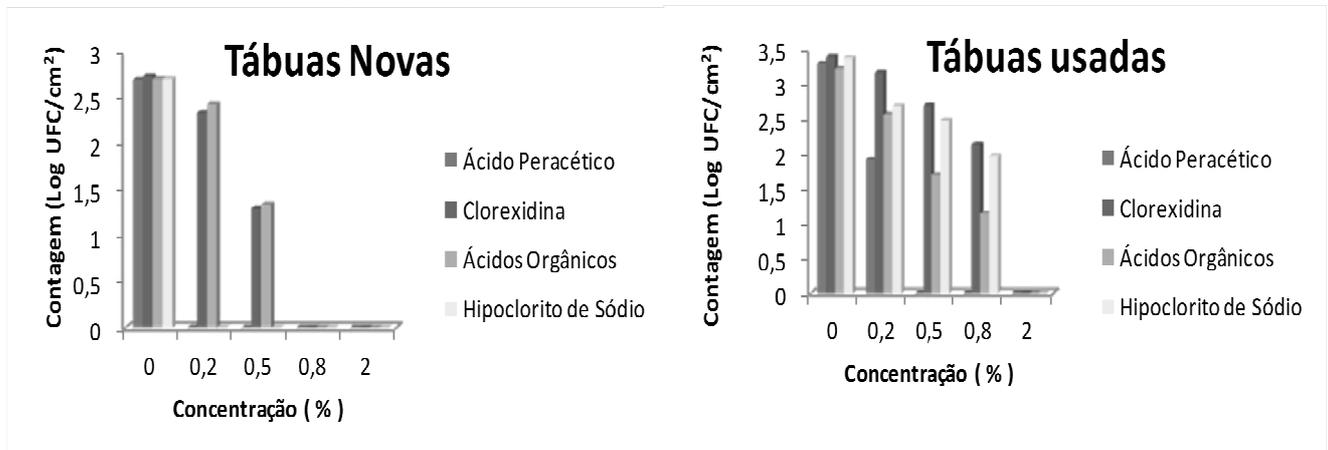
Verificou-se que a clorexidina e ácidos orgânicos apresentam reduções na contagem de *E. coli* em superfícies de corte novas e usadas (Figura 4:4.2), mas menos eficazes do que outros sanitizantes avaliadas neste trabalho. O mecanismo de ação de clorexidina é caracterizado pela absorção rápida de células bacterianas, resultando em várias alterações citológicas severas que afetam a permeabilidade e propriedades ópticas. A quantidade de agente químico absorvida é proporcional à sua concentração, a densidade da célula bacteriana, a composição e o pH. Pesquisadores apontam que a clorexidina reage com grupos lipófilos da célula, causando uma desorientação da membrana lipoproteína e gerando uma alteração na função de barreira osmótica (Andrade e Macedo, 1996).

A ação inibidora dos ácidos orgânicos na forma não dissociada é de 100 a 600 vezes maior do que a forma dissociada. Os ácidos orgânicos não dissociados podem permear a membrana celular por difusão e liberar prótons no citoplasma da célula. O influxo de prótons induz a acidificação do citoplasma e dissipa o potencial

de prótons da membrana (Eklund, 1983). Isto inibe o mecanismo de transporte de substrato, geração de energia e a síntese de macromoléculas (Diez-Gonzales e Russel, 1997).

Comparando os sanitizantes estudados neste trabalho, verificou-se que o ácido peracético, em uma concentração de 0,5%, foi completamente eficaz na remoção de *E. coli* em superfícies de corte novas e usadas, e também foi eficaz a 0,2% em superfícies novas. O hipoclorito de sódio mostrou-se eficaz na remoção das células com 0,5% em superfícies novas, no entanto, para ter o mesmo efeito em placas usadas foi necessário uma concentração de 2% (Figura 5:4.3).

A clorexidina e os ácidos orgânicos demonstraram efeitos similares, apresentando redução total da adesão, com 0,8 e 2% e 1 hora de contato, em superfícies novas e usadas, respectivamente. Estes resultados concordam com os obtidos por Silva et al. (2010), onde o ácido peracético foi mais eficiente que o composto quaternário de amônio cujo mecanismo de ação é semelhante à clorexidina. Além disso, os resíduos destes ácidos não são tóxicos e não afetam o produto final ou o processo de tratamento de resíduos (Kunigk e Almeida, 2001).



**Figura 5:4.3** - Eficiência entre os diferentes sanitizantes testados (ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos) em superfícies de corte novas e usadas, para *E. coli* com 1h de contato.

#### 4.5 Conclusões

Em ambas as superfícies estudadas, observou-se uma rápida adesão de *E. coli*, sendo a contagem menor em superfícies novas quando comparadas com as usadas. A adesão das bactérias em superfícies de corte de polietileno usadas reduz significativamente a ação dos sanitizantes. Entre os sanitizantes avaliados, o ácido peracético foi o mais eficiente para reduzir a contagem de *E. coli*. O ácido peracético foi eficaz sobre as superfícies de corte novas e usadas a uma concentração de 0,5% apresentando eliminação total do biofilme *E. coli*. Clorexidina e ácidos orgânicos demonstraram efeitos similares, reduzindo totalmente a adesão com 0,8 e 2% com 1 hora de contato, em superfícies novas e usadas, respectivamente. O hipoclorito de sódio removeu a adesão de *E. coli* em superfícies novas e usadas com concentrações de 0,5 e 2%, respectivamente.

Analisando-se os resultados apresentados a melhor opção para a redução da adesão de *E. coli* em superfícies de cortes de polietileno é a utilização de ácido peracético como sanitizante, apresentando-se ainda como uma boa segunda opção a hipoclorito de sódio.

Os resultados deste estudo demonstraram a importância dos procedimentos de higiene nas superfícies que entram em contacto com os alimentos. Verificou-se que a formação de biofilme pode ocorrer mesmo em um curto período de tempo, o que enfatiza a necessidade de bons procedimentos de limpeza durante o processamento de alimentos.

#### 4.6 Referências Bibliográficas

- Adetunji VO, Isola TO (2011) Adhesion of *E. coli* and *E. coli* O157: H7 Isolates from a Typical Tropical Abattoir on Wood, Steel and Glass Surfaces. *J. Microbiol*, 6:669-677.
- Allison DG, Mcbain AJ, Gilbert P (2000) *Biofilms: problems of control*. Cambridge University Press.
- Andrade NJ, Bridgeman TA, Zottola EA (1998) Bacteriocidal Activity of Sanitizers against *Enterococcus faecium* Attached to Stainless Steel as Determined by Plate Count and Impedance Methods. *J. food protection*, 61:833-838.
- Andrade NJ, Macedo JAB (1996) *Higienização na Indústria de Alimentos*. Varela, São Paulo.
- Beltrame CA, Kubiak GB, Lerin LA, et al. (2012) Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. *Food Sci Tech (Campinas)*, 32:228-232.
- Beltrame CA, Kubiak GB, Rottava I, et al. (2013) Comparative lethality kinetic curves and predictive models of F-value for *Listeria monocytogenes* using different sanitizers. *Food Sci Nutrition*, 1:27-31.
- Bower CK, McGuire J, Daeschel MA (1996) The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Sci Tech*, 7:152-157.
- Brooks JD, Flint SH (2008) Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int J Food Sci Tech*, 43:2163-2176.
- Cabeça TK, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL (2012) Activity of disinfectants against foodborne pathogens in suspension and adhered to stainless steel surfaces. *Braz J Microbiol*, 43:1112-1119.
- Chaturongkasumrit Y, Takahashi H, Keeratipibul S, Kuda T, Kimura B (2011) The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. *Food Control*, 22:1893-1899.
- Chawner JA, Gilbert P (1989) A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine. *J applied bacteriol*, 66:243-252.
- Chen G (2003) *Escherichia coli* adhesion to abiotic surfaces in the presence of non-ionic surfactants. *J Adhesion Sci Tech*, 17:2131-2139.

DeQueiroz GA, Day DF (2007) Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *J Appl Microbiol*, 103:794-802.

DeVere E, Purchase D (2007) Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. *Food Microbiol*, 24:425-430.

Diez-Gonzalez F, Russell JB (1997) The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. *Microbiol (Reading, England)*, 143 ( Pt 4):1175-1180.

Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, et al. (2011) Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int J food microbiol*, 149:262-268.

Druggan P, Forsythe SJ, Silley P (1993) Indirect impedance for microbial screening in the food and beverage industries. In: *New Techniques in Food and Beverage Microbiology*. (R. Kroll, A. Gilmour, eds), Academic Press, pp 120-125.

Eklund T (1983) The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J applied bacteriol*, 54:383-389.

Flach J, Karnopp C, Corção G (2005) Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33:291-296.

Frank JFE, J. Wicker, L., (2003) Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static condions. *Food Protection Trends*, 23:654-663.

Fratamico PM, Schultz FJ, Benedict RC, Buchanan RL, Cooke PH (1993) Factors Influencing Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to Beef Tissues and Removal Using Selected Sanitizing Rinses. *J food protection*, 59:453-459.

Hilbert LR, Bagge-Ravn D, Kold J, Gram L (2003) Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *Int Biodeterioration & Biodegradation*, 52:175-185.

Houari A, Di Martino P (2007) Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. In: *Lett Appl Microbiol*, England, pp 652-656.

Kitis M (2004) Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*, 30:47-55.

Krolasik J, Zakowska Z, Krepska M, Klimek L (2010) Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. *Polish journal of microbiology/Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists*, 59:281-287.

Kunigk L, Almeida MCB (2001) Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. *Braz J Microbiol*, 32:38-41.

Lejeune P (2003) Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends in Microbiology*, 11:179-184.

Manijeh M, Mohammad J, Roha KK (2008) Biofilm Formation by *Salmonella enteritidis* on Food Contact Surfaces. *J Biological Sci*, 8:502-505.

Marouani-Gadri N, Augier G, Carpentier B (2009) Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *Int J food microbiol*, 133:62-67.

Mc Donnel G, Russel AD (1999) Antiseptics and disinfectants: activity , action and resistance. *Clinical microbiol rev*, 12:147-179.

Miller AJ, Brown T, Call JE (1996) Comparison of Wooden and Polyethylene Cutting Boards: Potential for the Attachment and Removal of Bacteria from Ground Beef. *J food protection*, 59:854-858.

Mohammadi Z, Abbott PV (2009) The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. In: *Int Endod J*, England, pp 288-302.

Montville TJ, Matthews KR, Kniel KE (2012) *Food microbiology : an introduction*. Washington, DC : ASM Press, United States.

Mosteller TM, Bishop JR (1993) Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *J Food Protection*, 56:34-41.

Movassagh MH, Karami AR, Shayegh J (2010) Biofilm formation of *Escherichia coli* O111 on food-contact stainless steel and high-density polyethylene surfaces. *Global Veterinaria*, 4:447-449.

Parizzi SQF (1999) Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas. Minas Gerais, Brazil, 58p. (Msc. Dissertation, Institute of Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, UFV).

Rossoni EMM, Gaylarde CC (2000) Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J food microbiol*, 61:81-85.

Rutala WA, Weber DJ (1997) Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clinical microbiol rev*, 10:597-610.

Ryu JH, Beuchat LR (2005) Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Applied and environmental microbiol*, 71:247-254.

Silva ID, Careli RT, Lima JC, Andrade NJ (2010) Effectiveness of cleaning and sanitizing procedures in controlling the adherence of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Enteritidis*, and *Staphylococcus aureus* to domestic kitchen surfaces. *Food Sci Tech (Campinas)*, 30:231-236.

Srey S, Jahid IK, Ha S-D (2013) Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31:572-585.

## 5. ARTIGO 3

### ADESÃO DE *Listeria monocytogenes* EM SUPERFÍCIES DE CORTE E REMOÇÃO COM DIFERENTES SANITIZANTES

#### 5.1 Resumo

O objetivo do trabalho foi verificar a adesão bacteriana e a possível formação de biofilmes em superfícies de corte novas e usadas, impregnadas com *Listeria monocytogenes*, e avaliar a sua remoção usando diferentes concentrações de sanitizante químicos (Ácido orgânico, ácido peracético, hipoclorito de sódio e clorexidina). Os resultados mostram que o número de células aderidas aumentou com o tempo de contato para as superfícies avaliadas, tanto novas quanto usadas. Dentre os sanitizante testados para remoção de *L. monocytogenes* apresentaram melhores resultados o ácido peracético e o hipoclorito de sódio, evitando a possível formação de biofilmes em todos os tempos de contato nas superfícies testadas. A clorexidina, em sua concentração máxima (2,0%) permitiu o crescimento microbiano em superfícies novas e usadas após 72 horas de contato. Os ácidos orgânicos não se mostraram de grande eficiência, observando-se crescimento microbiano na concentração de sanitizante (2,0%) em 3 horas de contato em superfícies usadas, em a 6 horas de contato em superfícies usadas.

#### 5.2 Introdução

Apesar dos recentes avanços tecnológicos e científicos, observa-se a ocorrência de enfermidades de origem alimentar, devido à ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos. A formação de biofilmes ocorre em virtude da deposição e adesão de microrganismos em uma superfície de contato, as quais se fixam, constitui uma matriz de exopolissacarídeos e iniciam seu crescimento. Estes representam uma preocupação à indústria de alimentos por sua potencialidade em resistir a tratamentos antimicrobianos e à sanitizantes, além de causar deterioração, perda da qualidade ou veiculação de patógenos. Para evitar a formação de biofilme em indústrias alimentícias, deve-se atentar para a correta higienização das superfícies e equipamentos.

Na indústria alimentícia, a adesão de micro-organismos à superfície de equipamentos utilizados para o processamento de alimentos resulta em graves problemas, uma vez que o biofilme microbiano tem o potencial de atuar como fonte crônica de contaminação que pode comprometer a qualidade do alimento e representar graves riscos à saúde pública (Caixeta, 2008).

Uma vez instalado o biofilme, a resistência desses organismos sésseis aumenta, dificultando, assim, a ação dos sanificantes. A utilização de adequados e eficientes sanificantes em equipamentos sejam eles químicos ou físicos, para a manutenção da qualidade dos alimentos, pode evitar a formação de biofilmes e ou reduzir os índices de contaminação por micro-organismos.

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, frequentemente encontrada em produtos cárneos. É uma bactéria principalmente transmitida ao homem através dos alimentos. Ela pode causar gastroenterite leve ou infecções graves ou o aborto, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro, capaz de multiplicar-se em temperaturas abaixo de 0°C, pH 4,6 a 9,5 e a uma atividade de água abaixo de 0,92 (Buchanan et al, 2004; Gandhi e Chikindas, 2007). Ela encontra condições favoráveis de crescimento em pisos, ralos e equipamentos no interior das instalações da indústria alimentar, nomeadamente em ambientes frios e úmidos de salas refrigeradas. Cepas de *L. monocytogenes* são recorrentemente encontradas em superfícies de indústria alimentar, nomeadamente em locais refrigerados, embora estes sejam rotineiramente limpos e desinfetados (Carpentier, 2011).

Diferentes grupos de desinfetantes químicos são utilizados pela indústria de alimentos para eliminar bactérias associados às superfícies de contato com alimentos e mãos de manipuladores. A eficácia dos desinfetantes contra células planctônicas (em suspensão) é geralmente maior do que contra células num biofilme, as células bacterianas que tenham se ligado a superfícies inertes e são expostas periodicamente a um agente sanitizante podem desenvolver sensibilidade diminuída ou resistência a esse agente. A riqueza de produtos disponíveis para uso é impressionante. (S. Riazi, K.R. Matthews 2011)

Objetivou-se, com a realização deste estudo, avaliar a capacidade de adesão por *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em superfícies de corte novas e usadas comumente utilizadas na indústria de alimentos, determinando a potencialidade da remoção da adesão bacteriana pelo uso dos sanificantes químicos ácido orgânico,

ácido peracético, hipoclorito de sódio e clorexidina a fim de determinar o mais eficiente nesta remoção..

### **5.3 Material e Métodos**

#### **5.3.1 Superfície avaliada para a adesão bacteriana**

O material da superfície de processamento de alimentos avaliada neste estudo foi tábua de corte de polietileno novas e usadas de polietileno de alta densidade. As superfícies usadas tinham 3 meses de uso industrial. As superfícies foram cortadas e cubos de 1,0cm × 1,0cm, sendo limpas por escovagem empregando detergente líquido e água, e lavadas com água destilada. Em seguida, imersas em etanol a 70%, durante 1 h, para a remoção de gordura e novamente lavadas com água destilada e secas ao ar. As superfícies foram expostas à luz ultravioleta 254 nm durante 1 h para desinfecção, tal como descrito por Parizzi (1999), antes da deposição de quaisquer culturas bacterianas.

#### **5.3.2 Adesão de *Escherichia coli* em superfícies de processamento de alimentos**

Para estudar a adesão foi utilizada uma cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), previamente crescida em caldo de Luria Bertani - LB (triptona 10,0 g L<sup>-1</sup>, extracto de levedura 5,0 g L<sup>-1</sup>, NaCl a 5,0 g L<sup>-1</sup>).

As superfícies limpas foram imersas, a temperatura ambiente, em frascos contendo 100 mL de caldo LB acrescido de um volume de suspensão de células bacterianas, de forma a obter-se uma contagem de 10<sup>3</sup> UFC/mL. As superfícies devidamente esterilizadas (3 cubos para cada tempo) foram imersas nesse erlenmeyer com auxílio de uma pinça esterilizada e, então, incubados a 37°C. As avaliações da quantidade de células aderidas por centímetro quadrado foram realizadas durante 72 horas (0,1; 1; 3; 6; 12; 24; 48; e 72h) de contato, em cada superfície. O tempo zero corresponde à análise realizada imediatamente após a imersão das superfícies no frasco contendo o meio de cultura e a suspensão bacteriana. As análises foram realizadas em triplicata.

Concluído o período de incubação, as superfícies foram retiradas da suspensão de bactérias em caldo LB com *L. monocytogenes*, com auxílio de uma pinça esterilizada

e imersos separadamente em 10mL de água peptonada a 0,1% por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersas em tubos contendo 5 mL da mesma solução diluente e submetidas ao vórtex, durante 1 minuto para a remoção das células sésseis (Parizzi, 1999). As áreas de contato foram esfregadas para baixo 10 vezes exercendo uma pressão sobre a superfície de contato. Os microorganismos aderidos aos cotonetes foram transferidos para tubos contendo 10 mL de água de peptona a 0,1% (p / v) esterilizado a 121 ° C durante 15 minutos. O tubo foi agitado utilizando um vortex durante alguns segundos para libertar as bactérias do cotonete. Em seguida, 1 ml da solução foi cuidadosamente semeada em placas de agar LB, incubadas a 35-37 ° C durante 24 horas, para contagem de colônias.

### **5.3.3 Eficiência de diferentes sanitizantes sobre *Escherichia coli* em superfícies de processamento de alimentos**

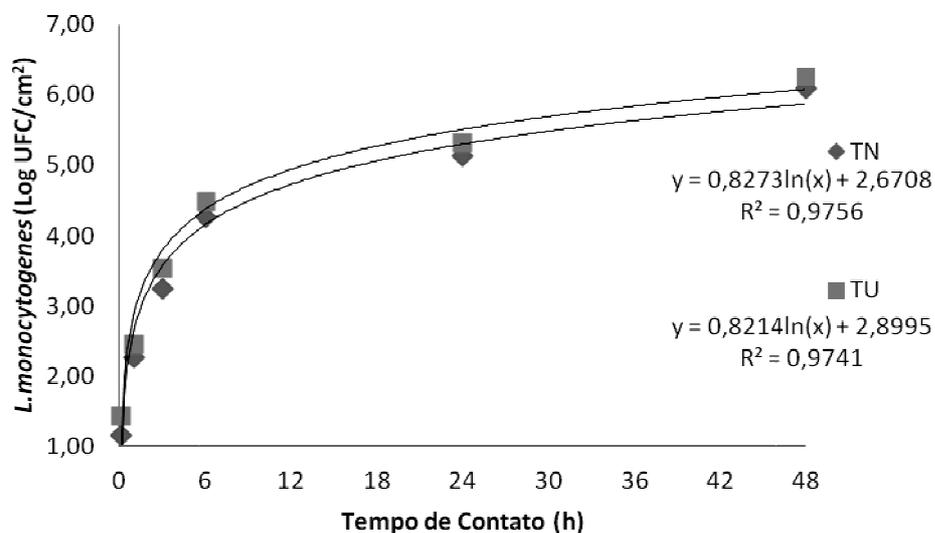
Os desinfetantes utilizados neste estudo foram escolhidos por representarem os mais utilizados na indústria alimentar. As superfícies aderidas com *E. coli* foram, então, submetidos a diferentes desinfetantes: ácido peracético 15% (Johnson Diversey, São Paulo -SP, Brasil), clorexidina 20% ( Neobrax, São Paulo- SP, Brasil), hipoclorito de sódio a 10 % (CSM Produtos Químicos Ltda, Chapecó - SC , Brasil) e ácidos orgânicos (formulada com 30% de ácido láctico, 3% de ácido cítrico, 3% de ácido ascórbico, e 7 % de sais de ácidos graxos em água (AD FOODS Indústria Produtos Alimentícios Ltda, Laguna - SC, Brasil). Para cada sanitizante, foram investigadas diferentes concentrações (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0 %) durante 10 minutos de exposição, para avaliar sua eficiência frente adesão bacteriana. Estes agentes foram diluídos com água destilada esterilizada de acordo com as instruções do fornecedor.

A adesão bacteriana foi avaliada pela técnica da contagem padrão em placas (CPP), onde foram realizados swabs nas superfícies previamente sanitizadas. Os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup>. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em termos de valores médios.

## 5.4 Resultados e Discussões

### 5.4.1. Adesão de *Listeria monocytogenes* em superfícies de corte pela contagem padrão em placas

Os resultados que mostram a adesão da *L. monocytogenes* em ambas as superfícies experimentais, durante os tempos de exposição das superfícies ao micro-organismo estão apresentadas na Figura 6:5.1. O número máximo de adesão de células viáveis foi da ordem de 6,6 Log UFC/cm<sup>2</sup> para as superfícies usadas e 6,3 Log UFC/cm<sup>2</sup> para as superfícies novas. A figura 6:5.1 demonstram uma adesão semelhante para as duas superfícies avaliadas.



**Figura 6:5.1:** Quantificação de *E. coli* em placas de cortes novas e usadas sem a presença de sanitizantes. ( TN= Superfícies novas; TU = Superfícies usadas ).

Wirtanen et al. (1996) e Andrade et al. (1998b) relataram que, para a formação de biofilme ocorrer, o número de células de adesão deve variar de 5 - 7 Log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente, neste caso a formação de biofilme ocorreu apenas a partir de 24h, porém segundo abordagem de Ronner e Wong (1993) que consideraram como biofilme um número de 3,0 log UFC/cm<sup>2</sup> de células, haveria possível formação de biofilme a partir de 3 horas de contato com o micro-organismo, considerando um ambiente de trabalho industrial indica que é necessário cuidados na manipulação e higienização em intervalos pré definidos durante o processo para evitar a formação de biofilmes, porém não é comum uma rotina de trabalho superior a 8 horas sem intervalo para higiene das estações de processamento de alimentos.

Como demonstrado na Figura 6:5.1, superfícies usadas apresentaram pequena diferença na intensidade da adesão, em comparação com superfícies novas, com uma diferença inferior a um ciclo logaritmico. É importante ressaltar que as superfícies usadas possuem rugosidades que facilitam a adesão dos microorganismos e dificultam os procedimentos de higiene e limpeza. Conforme P. Teixeira et al.2008 é do conhecimento geral que um aumento na rugosidade da superfície causará um aumento correspondente na retenção microbiana e isto tem sido confirmado pelo trabalho de vários autores, Beresford et al. (2001) estudaram a adesão de *L. monocytogenes* a vários materiais, tais como, inox , polímeros, metais e borrachas e constataram o grande poder de adesão, como no presente trabalho, que o polietileno com rugosidades apresenta.

#### **5.4.2 Eficiência do ácido peracético na remoção de *L. monocytogenes***

A Tabela 6:5.1 apresenta dados referentes à remoção de *L. monocytogenes* em superfícies de corte de polietileno, novas e usadas, durante 72 horas, empregando diferentes concentrações de Ácio Peracético (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%).

Nas superfícies de corte novas é possível verificar uma eficiente remoção da *L. monocytogenes* com concentração de 0,5% de sanitizante após 6 horas de contato, porém isso não ocorre nas superfícies usadas que nessa mesma concentração e tempo apresenta uma adesão de 1,01 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Isso pode ocorrer devido a maior presença de ranhuras em superfícies usadas dificultando a ação do ácido peracético, devido a dificuldade de contato entre o ácido e as células.

Com concentrações de 0,8% ou menor de ácidos peracético percebemos a possível formação de biofilmes a partir de 48 horas para superfícies novas e de 24 horas para superfícies usadas. Sendo que Ronner e Wong (1993) consideraram como biofilme um número de 3,0 log UFC/cm<sup>2</sup> de células.

**Tabela 6:5.1** - Contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de células de *L. monocytogenes* aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de ácido peracético (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%).

Concentração de ácido Peracético (%)	Tempo de contato (h)						
	0,1	1	3	6	24	48	72
<b>Superfícies de corte novas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,3	2,36	3,52	4,78	5,79	6,74	6,81
0,2	0	0	1,31	1,36	3,76	4,95	5,94
0,5	0	0	0	0	2,76	4,59	4,76
0,8	0	0	0	0	2,32	3,50	3,78
2,0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Superfícies de corte usadas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,34	2,44	3,63	4,87	5,82	6,78	6,92
0,2	0	0	2,14	3,08	4,32	5,51	6,79
0,5	0	0	1,01	2,72	4,07	4,45	5,57
0,8	0	0	0	1,18	3,50	3,72	4,74
2,0	0	0	0	0	0	0	0

Avaliando-se o desempenho do ácido peracético em um tempo de 3 horas, tempo usual de troca de superfícies em uma indústria, vemos um bom desempenho do mesmo, pois em concentrações usuais de 0,5% para tabuas novas e 0,8% para superfícies usadas temos a total remoção da *L. monocytogenes* aderida. Um estudo realizado por Briñez et al. (2006) avaliou o efeito bactericida de ácido peracético contra estirpes patogênicas e não patogênicas de *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. e *Escherichia coli*, os autores verificaram que o mesmo foi efetivo (redução maior que 5 log UFC mL<sup>-1</sup>) em concentrações de 0,1 % e 10 minutos de exposição em todos os casos. Ainda notamos que foi possível a remoção total da *L. monocytogenes* em todos os tempos analisados com uma concentração de Ácido Peracético, 2%, tanto em superfícies de corte novas quanto em usadas.

### 5.4.3 Eficiência do clorexidina na remoção de *L. monocytogenes*

A Tabela 7:5.2 apresenta dados referentes à remoção de *L. monocytogenes* em superfícies de corte de polietileno, novas e usadas, durante 72 horas, empregando diferentes concentrações de clorexidina (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%).

**Tabela 7:5.2** - Contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de células de *L. monocytogenes* aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de clorexidina (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%).

Concentração de Clorexidina (%)	Tempo de contato (h)						
	0,1	1	3	6	24	48	72
<b>Superfícies de corte novas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,01	2,11	3,92	4,91	5,22	5,69	6,49
0,2	0	0	3,79	4,74	5,05	5,14	6,11
0,5	0	0	0	3,89	4,87	4,98	5,94
0,8	0	0	0	0	2,69	2,98	4,26
2,0	0	0	0	0	1,15	2,11	2,13
<b>Superfícies de corte usadas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,43	2,54	4,15	5,04	5,48	6,06	6,75
0,2	0	0	3,96	4,98	5,35	5,42	6,31
0,5	0	0	3,29	3,88	4,45	4,69	5,78
0,8	0	0	0	3,62	4,12	4,41	5,23
2,0	0	0	0	0	2,01	2,71	3,30

Analisando-se a Tabela 7:5.2 verifica-se que após 3 horas de contato as superfícies novas necessitam de uma concentração de 0,5% de Clorexidina para a remoção total da *L. monocytogenes*, sendo que para as superfícies usadas nesta mesma concentração e tempo podemos notar a possível formação de biofilmes. De acordo com Jeong & Frank (1994), *L. monocytogenes* apresenta alta capacidade de colonização de superfícies e de formação de biofilme. Com concentração de 0,5%, indicada pelo fornecedor, em 6 horas de contato já é possível observar a possível formação de biofilmes, tanto em superfícies novas como em superfícies usadas.

Um relevante dado é que tanto em superfícies novas como em superfícies usadas após 24 horas de contato não foi possível a remoção total da células, nem usando-se a concentração de 2% de clorexidina.

#### 5.4.4 Eficiência dos Ácidos Orgânicos na remoção de *L. monocytogenes*

A Tabela 8:5.3 apresenta dados referentes à remoção de *L. monocytogenes* em superfícies de corte de polietileno, novas e usadas, durante 72 horas, empregando diferentes concentrações de Ácidos Orgânicos (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%).

**Tabela 8:5.3** - Contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de células de *L. monocytogenes* aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de ácidos orgânicos (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%).

Concentração de ácidos orgânicos (%)	Tempo de contato (h)						
	0,1	1	3	6	24	48	72
<b>Superfícies de corte novas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,21	2,26	2,82	3,57	4,76	5,94	6,11
0,2	0	1,14	2,76	3,34	4,05	5,14	5,79
0,5	0	0	1,54	2,89	3,93	4,87	4,93
0,8	0	0	1,02	2,49	2,75	3,92	4,28
2,0	0	0	0	1,38	2,32	2,82	2,98
<b>Superfícies de corte usadas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,51	2,42	3,58	4,03	4,96	6,03	6,45
0,2	0	2,26	3,42	3,68	4,32	5,54	6,12
0,5	0	1,30	2,38	2,98	4,02	4,92	5,28
0,8	0	1,08	2,14	2,17	2,94	4,05	4,93
2,0	0	0	1,48	1,37	2,78	3,72	3,87

O uso de ácidos orgânicos apresentou baixa eficiência na remoção *L. monocytogenes*, pois mesmo em uma concentração elevada, 2%, após 6 horas de contato, não foi eficiente na remoção total das células aderidas, tanto em superfícies

novas como usadas. Dados também encontrados por Van Netten et al. (1994) que estudaram a ação bactericida do ácido láctico (em Silva, J. A.; 2001) a 2,0% em bactérias patogênicas presentes em carne, cujos testes foram realizados in vitro, em intervalos de tempo entre 30 e 120 segundos onde o tratamento foi efetivo contra *Campylobacter jejuni* e *Salmonella typhimurium*, mas revelou-se ineficiente contra *Listeria monocytogenes* e enterobactérias mesófilas.

Em concentrações mais baixas, de 0,5%, já indica a possível formação de biofilme a partir de 24 horas de contato, tanto em superfícies novas como em superfícies usadas, com contagem acima de 3,0 Log UFC/cm<sup>2</sup>. O tempo de contato entre o sanitizante e a superfície que continha a *L. monocytogenes*, que foi de 10 minutos pode ter afetado o desempenho dos ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos apresentam bom desempenho frente a *L. monocytogenes* quando o tempo de exposição da mesma frente aos ácidos foi superior a 15 minutos de contato entre o sanitizante testado e a bactéria. (Beltrame et al., 2012)..

#### **5.4.5 Eficiência dos Hipoclorito de Sódio na remoção de *L. monocytogenes***

A Tabela 9:5.4 apresentam dados referentes à remoção de *L. monocytogenes* em superfícies de corte de polietileno, novas e usadas, durante 72 horas, empregando diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%).

Para um tempo de contato de 6 horas vemos uma boa eficiência do hipoclorito de sódio com uma concentração de 0,5%, conseguindo realizar a remoção de toda a *L. monocytogenes* aderida nas superfícies novas, porem quando analisamos a eficiência nesse mesmo tempo em relação as superfícies usadas vemos que ocorre a necessidade de se utilizar uma maior concentração, de 2%, para conseguirmos a remoção completa das células aderidas, ou seja, nesse tempo de contato necessitamos de uma concentração 4 vezes maior para as superfícies de corte usadas em relação as novas, com o objetivo de realizar a remoção total da *L. monocytogenes*.

**Tabela 9: 5.4** - Contagem (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de células de *L. monocytogenes* aderidas em superfícies de cortes novas e usadas, em 72 horas de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%).

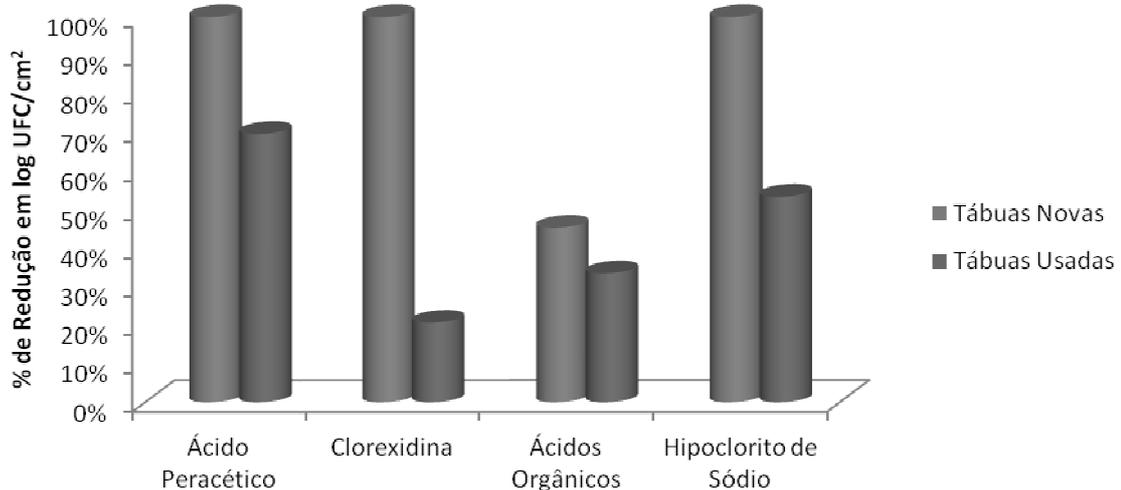
Concentração de hipoclorito de sódio(%)	Tempo de contato (h)						
	0,1	1	3	6	24	48	72
<b>Superfícies de corte novas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,14	2,32	2,73	3,8	4,73	6,02	6,15
0,2	0	0	1,11	1,23	2,85	3,74	5,13
0,5	0	0	0	0	1,53	3,07	3,95
0,8	0	0	0	0	1,04	1,61	2,55
2,0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Superfícies de corte usadas (Log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>							
0	1,4	2,36	2,79	3,94	4,97	6,17	6,47
0,2	0	0	2,23	3,11	4,23	4,83	6,10
0,5	0	0	1,30	2,63	3,80	3,94	4,79
0,8	0	0	0	1,04	2,75	2,91	3,92
2,0	0	0	0	0	0	0	0

Quando analisamos um tempo superior a 24 horas de contato verificamos que tanto para superfícies novas como superfícies usadas é necessária uma concentração de 2% para a remoção total das células aderidas. A maior concentração de bactérias com o tempo ocasiona a maior presença de matéria orgânica o que resulta em uma perda de eficiência do Hipoclorito de sódio.

Analisando-se o desempenho geral do hipoclorito vemos que mesmo em um tempo elevado de exposição, 72 horas, ele conseguiu a remoção completa da *L. monocytogenes* aderida. Também Aarnisalo et al. (2007), avaliando a resistência de cepas de *Listeria monocytogenes* a oito diferentes desinfetantes utilizados na indústria alimentícia, entre eles o hipoclorito de sódio, demonstraram ausência de efetividade do referido composto para o teste de suspensão, porém com resultados satisfatórios para o teste de aderência à superfície.

#### 5.4.6 Avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos

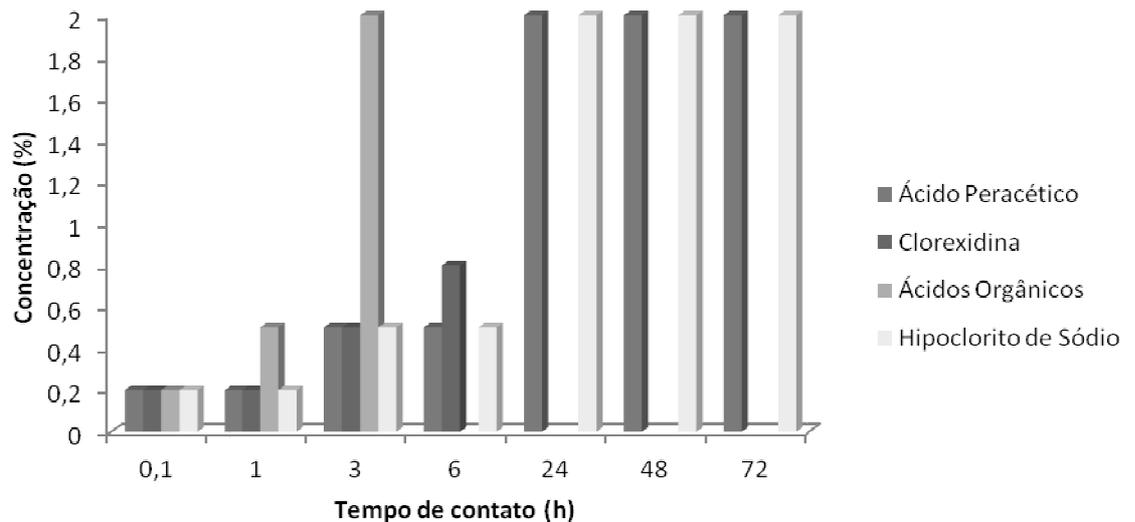
Para comparar a eficiência da ação dos sanitizantes utilizados na indústria de alimentos, o ácido peracético, a clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos, foi avaliada a redução de Log UFC/cm<sup>2</sup> de *L. monocytogenes*, utilizando-se uma concentração de 0,5% por 3 horas de contacto com as superfícies de corte novas e usadas conforme apresentado na Figura 7:5.2. Este tempo de contato e a concentração de uso foram escolhidos devido a serem os mais usuais nas indústrias de alimentos.



**Figura 7:5.2** - Redução da contagem inicial da adesão de *E. coli* em superfícies de corte novas e usadas, durante 3h, sanitizadas com 0,5% de ácido peracético, clorexidina, hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos

Na Figura 7:5.2 notamos um bom desempenho dos sanitizantes testados em 3 horas de contato, com uma concentração de 0,5%, em superfícies novas, com exceção dos ácidos orgânicos que conseguiu uma redução de apenas 45% da carga inicial de *L. monocytogenes*. Porém o desempenho em superfícies de cortes usadas já não é mais tão satisfatório, nenhum dos princípios ativos conseguiu realizar uma redução de 100% da carga inicial de *L. monocytogenes*, sendo o melhor desempenho atingido pelo ácido peracético com uma redução de 70%. A clorexidina com 21% de redução e os ácidos orgânicos com 34% de redução foram os piores

desempenhos nas superfícies de corte usadas. A maior fixação das células devido a presença de ranhuras em superfícies usadas pode explicar essa queda de efetividade de todos os princípios ativos. As células estão envolvidas em uma matriz polimérica e são diferentes fenotipicamente de quando crescem em suspensão. Uma das maiores diferenças é o aumento da resistência, na ordem de 10 vezes a 100 vezes, aos agentes antimicrobianos (Druggan et al., 1993).

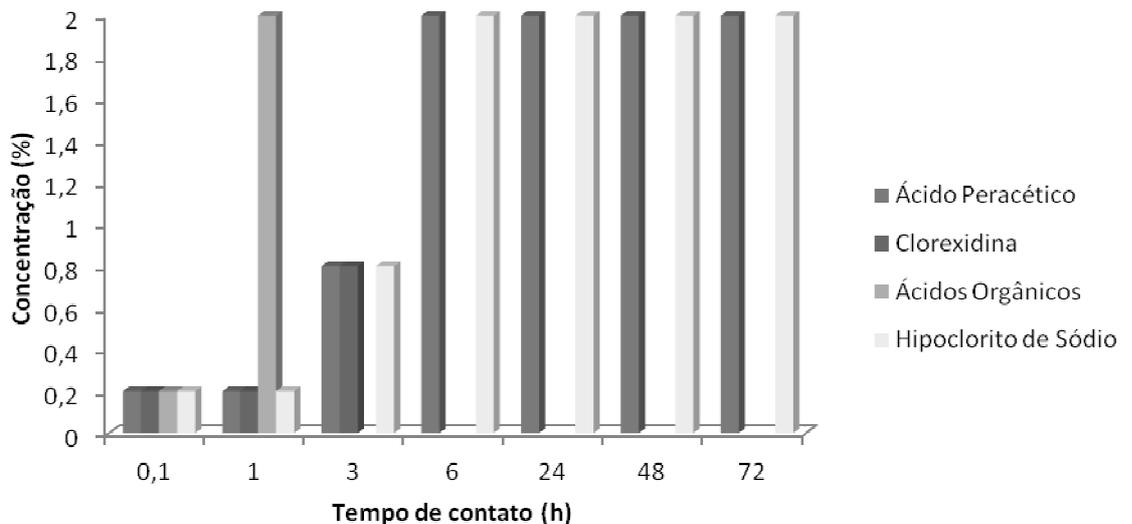


**Figura 8:5.3** - Concentração necessária para a remoção total de *L. monocytogenes* em superfícies de cortes novas.

Analisando-se a Figura 8:5.3 verificamos que o desempenho dos ácidos orgânicos na remoção total das células aderidas em superfícies de corte novas foi muito ruim, pois mesmo em concentrações elevadas de 2% não foi possível a remoção total após 6 horas de contato, este fraco desempenho dos ácidos orgânicos pode estar relacionado ao pouco tempo de contato entre as bactérias/superfície e o princípio ativo, Os ácidos orgânicos apresentam bom desempenho frente a *L. monocytogenes* quando o tempo de exposição da mesma frente aos ácidos foi superior a 15 minutos de contato entre o sanitizante testado e a bactéria.(Beltrame et al., 2012).

A clorexidina também apresentou um fraco desempenho pois após 24 horas de contato não conseguindo remover as células aderidas nem utilizando uma concentração de 2%. Nas Figuras 8:5.3 e 9:5.4 quando a barra do sanitizante não aparece indica que o mesmo não atingiu a remoção total das células aderidas naquele tempo indicado, com as concentrações testadas.

O ácido peracético e o hipoclorito de sódio tiveram um desempenho similar na remoção de *L. monocytogenes* em superfícies de corte novas, conseguindo a remoção total das células aderidas mesmo após 72 horas de contato, sendo que conseguem efetuar a remoção total com a mesma concentração em um mesmo tempo de contato. Segundo Negretti 2008, uma das grandes vantagens do ácido peracético frente aos demais sanitizantes é que este não fixa a matéria orgânica e impede a formação de biofilmes, o mesmo autor obteve uma redução de 2 a 3 log em populações de células associada a cupons de inox.



**Figura 9:5.4** - Concentração necessária para a remoção total de *L. monocytogenes* em superfícies de cortes usadas.

O desempenho dos sanitizantes testados nas tabuas de corte novas é semelhante ao desempenho em superfícies de corte usadas, como pode ser observado na Figura 9:5.4, o ácido peracético e o hipoclorito continuam sendo eficientes na remoção total mesmo após 72 horas de contato, ambos necessitam de uma concentração de 2% para isso, já a clorexidina não consegue realizar a remoção total a partir de 24 horas mesmo usando uma concentração de 2%, o desempenho dos ácidos orgânicos também não é eficiente a partir de 3 horas de contato mesmo com a concentração de 2%.

## 5.5 Conclusão

A *Listeria monocytogenes* foi capazes de aderir de maneira semelhante em

superfícies de corte novas e usadas atingindo contagens da ordem de 6,6 Log UFC/cm<sup>2</sup> para as superfícies usadas e 6,3 Log UFC/cm<sup>2</sup> para as superfícies novas.

Dentre os sanitizante testados apresentaram melhores resultados o ácido peracético e o hipoclorito de sódio, evitando a formação de biofilmes em todos os tempos de contato nas superfícies testadas.

A clorexidina, em sua concentração máxima (2,0%) permitiu a possível formação de biofilmes em superfícies usadas após 72 horas de contato e, em superfícies novas, houve crescimento microbiano, embora não caracterizasse formação de biofilme.

Os ácidos orgânicos não se mostraram de grande eficiência, observando-se crescimento microbiano mesmo na concentração máxima de sanitizante (2,0%) em 3 horas de contato em superfícies usadas, e crescimento microbiano em superfícies novas em a 6 horas de contato.

Analisando-se os resultados chega-se a conclusão de que o ácido peracético é a melhor alternativa para ser usado no controle da adesão bacteriana em superficies de polietileno na industria de alimentos, pode-se dizer que o hipoclorito pode ser uma alternativa ao ácido peracético porem com um rendimento inferior.

A clorexidina não apresentou bom desempenho na remoção de células aderidas, assim como os ácidos orgânicos, para os ácidos orgânicos seria interessante um novo teste com um tempo de contato maior entre a superficie com as bactérias aderidas e a solução sanitizante.

## 5.6 Bibliografía

Aarnisalo, Kaarina et al.(2007) Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. Food Science and Technology. v.40, n.6, 1041-1048.

Andrade, N. J., C. L. O. Pinto, and M. S. Rosado. 2008. Controle da higienização na indústria de alimentos. Pp. 185–221 in N. J. Andrade, ed. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. Varela, São Paulo

Beltrame CA, Kubiak GB, Lerin LA, et al. (2012a) Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product

concentration. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 55:997-999

Beresford, M.R., Andrew, P.W. & Shama, G. (2001). *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 1000–1005.

Buchanan, R., Lindqvist, R., Ross, T., Smith, M., Todd, E., Whiting, R., (2004) Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Microbiological Risk Assessment Series, 4. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (Italy).

Briñez, W. J.; ; Roig-sagués, A. X.; Herrero, M. H.; López-Pedemonte & Guamis, B. ( 2006) Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. *Food Control*, v. 17,516-521,

Caixeta, D.S. (2008) Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Lavras: UFLA, 75 p.: il.

Carpentier, B., Cerf, O. (2011) - Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment premises, *International Journal of Food Microbiology* 145, 1-8

Gandhi, M., Chikindas, M.L. ( 2007) *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, 1–15.

Jeong, D.K.; Frank.; J.F. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* at 100C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection*, v.57, 576-586.

Marques, S.C. *et al.* (2007) Formation of biofilms by *staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:538-543.

P. Teixeira et al. (2008) Adhesion of *L. monocytogenes* to kitchen materials *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1239–1244 .Braga, Portugal

S. Riazi, K.R. Matthews (2011) Failure of foodborne pathogens to develop resistance to sanitizers following repeated exposure to common sanitizers. Shadi Riazi, Karl R. Matthews\*, USA *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 374e378

Ronner, A. B. & Wong, A. C. L. (1993) Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. *Journal of Food Protection*, v. 56, p. 750-758.

Silva, J. A.; Soares L. F.; Costa, E. L. (2001) Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão - Revista TeC Carnes - pesquisa Campinas, SP, v.3, n.1, p.19-26, <<http://www.comciencia.br/teccarnes/artigos.htm>>

Van Netten, P., J. H. J. Huis in't veld, and D. A. A. Mossel. (1994) The immediate bactericidal effect of lactic acid on meat-borne pathogen. *Appl. Bacteriol.* 77:490–496

Wirtanen, G.; Husmark, U.; Mattila-Sandholm, T. (1996) Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilm after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing system. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.59, n.7, p. 727-733.

## 6. CONCLUSÃO

Foi possível determinar os valores de D para os sanitizantes testados (ácido peracético, clorexidina e ácidos orgânicos), sendo que baixos valores do mesmo foram encontrados para os ácidos orgânicos, 1,18min, e para a clorexidina 1,38 min, já para os ácidos orgânicos o valor encontrado foi mais elevado, 6,45 min.

Através da regressão linear dos valores de D foi possível determinar os valores Z para o ácido peracético, -0,279, clorexidina, -0,121 e ácidos orgânicos, -3,646.

Para a redução de  $6 \log_{10}$  de *L. monocytogenes*, utilizando ácido peracético, com concentrações de 0,2%, 0,1%, e 0,05% são necessários 7,08; 31,08 e 130,44 minutos de contacto (valores de F), respectivamente. Sob as mesmas condições, obteve-se os valores de F de 8,28; 18,52; 55,87 minutos para a clorexidina e 30,54; 32,58; e 33,6 minutos para os ácidos orgânicos.

A clorexidina e o ácido peracético mostraram elevada eficiência, em concentrações acima de 0,15%, em comparação com a utilização de ácidos orgânicos.

Os modelos matemáticos dos valores F mostraram que em concentrações abaixo de 0,15% pode-se verificar um aumento exponencial nos valores F, tanto de clorexidina como ácido peracético.

Os ácidos orgânicos apresentaram um comportamento linear, mostrando ligeira variação nos valores de F, mesmo nas concentrações menores.

Os resultados, de valores D e F, obtidos são de fundamental importância em termos de estratégia industrial para o processo de sanitização, permitindo escolher o melhor produto usando a relação de concentração/tempo de exposição, visando à redução de custos, sem comprometer a eficiência do desinfetante.

A adesão bacteriana de *E. coli* em superfícies de corte de polietileno usadas reduz significativamente a ação dos sanitizantes.

Entre os sanitizantes avaliados, o ácido peracético foi o mais eficiente para reduzir a contagem de *E. coli*, sendo eficaz sobre as superfícies de corte novas e usadas a uma concentração de 0,5% apresentando eliminação total do biofilme *E. coli*.

A clorexidina e ácidos orgânicos demonstraram efeitos similares, reduzindo totalmente a adesão de *E. coli* com concentrações de 0,8 e 2% em superfícies novas e usadas, respectivamente.

O hipoclorito de sódio removeu a adesão de *E. coli* em superfícies novas e usadas com concentrações de 0,5 e 2%, respectivamente.

A *Listeria monocytogenes* foi capazes de aderir de maneira semelhante em superfícies de corte novas e usadas atingindo contagens da ordem de 6,6 Log UFC/cm<sup>2</sup> para as superfícies usadas e 6,3 Log UFC/cm<sup>2</sup> para as superfícies novas.

Dentre os sanitizante testados apresentaram melhores resultados o ácido peracético e o hipoclorito de sódio, evitando a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em todos os tempos de contato nas superfícies testadas.

A clorexidina, em sua concentração máxima (2,0%) permitiu a possível formação de biofilmes *L. monocytogenes* em superfícies usadas após 72 horas de contato e, em superfícies novas, houve crescimento microbiano, embora não caracterizasse formação de biofilme.

Os ácidos orgânicos não se mostraram de grande eficiência, observando-se crescimento microbiano de *L. monocytogenes* mesmo na concentração máxima de sanitizante (2,0%) em 3 horas de contato em superfícies usadas, e crescimento microbiano em superfícies novas em a 6 horas de contato.

Como resultado geral demonstrou-se que o ácido peracético apresenta-se como a melhor opção para a remoção tanto de *E. coli*, como de *L. monocytogenes* em superfícies de polietileno usadas nas indústrias de alimentos.

A maior resistência das bactérias em superfícies usadas demonstra claramente a necessidade de além de se ter um bom controle sobre a higienização das mesmas, se controlar a troca por superfícies novas quando as mesmas apresentarem um desgaste excessivo.

Os resultados deste estudo demonstraram a importância dos procedimentos de higiene nas superfícies que entram em contacto com os alimentos. Verificou-se que a adesão bacteriana pode ocorrer mesmo em um curto período de tempo, e que mesmo altas concentrações de sanitizantes podem não ser eficientes no controle microbiológico das instalações e equipamentos. O que enfatiza a necessidade de bons procedimentos de limpeza durante o processamento de alimentos.

## 7.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudo similar avaliando a adesão bacteriana e a eficiência dos sanitizantes sobre bactérias de interesse industrial, tais como *Salmonella*;
- Avaliar a formação de biofilmes em diferentes materiais como inox que é largamente utilizado em indústrias de alimentos;
- Avaliação da resistência dos micro-organismos frente à utilização de um sanitizante durante longo período.
- Avaliar o desempenho dos ácidos orgânicos na remoção de bactérias aderidas utilizando-se um tempo de contato maior entre as bactérias e a solução sanitizante.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, G.; DEBRAY, E.; CANDAU, Y. & PIAR, G. **Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores**. Applied and Environmental Microbiology, 1990, v. 56, 3073-3080.

ADAMS, C. A. NUTRICINES. **Food components in Health and Nutrition**. Nottingham. Nottingham Univ. Press, 1999.

AKERS, M. J.; BOAND, A. V. & BINKLEY, D. A. **Preformulation method for parenteral preservative efficacy evaluation**. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1984, v. 73, 903-905.

ALLISON, D.G.; MCBAIN, A.J.; GILBERT, P, **Biofilms: problems of control**. In: GILBERT, P.; LAPPIN-SCOTT, M.; WILSON, M. (Eds). Community Structure and Cooperation in Biofilms . Cambridge: University Press, 2000, 309-328.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. **Controle da higienização na indústria de alimentos**. In: ANDRADE, N.J. (Ed). Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008, p.185-221.

ANDRADE, N. J. & MACEDO, J. A. B. **Higienização na Indústria de Alimentos**, São Paulo, Varela, 1996.

ANDRADE, N.J., BRIDGEMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.7, p.833-838, 1998a.

ANDRADE, N.J.; AJAO, D.B.; ZOTTOLA, E.A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, p.1454- 1458, 1998b.

ASSELT, A. J.; GIFFEL, M. C. Pathogen resistance to sanitizers. In: LELIEVELD, H.L.M.; BAQUERO, F.; NEGRI, M.C.; MOROSINI, M.I. Antibiotic-Selective Environments. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v.27, p.S5-S11, 1998.

ASSELT, A.J.; GIFFEL, M.C. Pathogen resistance to sanitizers. In: LELIEVELD, H.L.M.; MOSTERT, M.A.; HOLAH, J. (Eds). Handbook of Hygiene Control in the Food Industry. England: Woodhead Publishing Limited, 2005. p.69-92.

BARBOSA, H. R. & TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 196p., 1999.

BEECH, I.B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms – current understanding and state of the art methods of study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v.53, p.177-183, 2004.

- BEECH, I.B.; GAYLARDE, C.C. Adhesion of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* to mild steel surfaces. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.67, p.201-207, 1989.
- BEER, D.; SRINIVASAM, R.; STEWART, S. Direct measurement of chorine penetration into biofilm during disinfection. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.4339-4344, 1994.
- BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, p.1000-1005, 2001.
- BERNARDEAU, M., VERNOUX, J.P., GUEGUEN, M. Usefulness of epifluorescence for quantitative analysis of lactobacilli in probiotic feed. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91, p.1103-1109, 2001.
- BLOCK, S. S. **Desinfection, sterilization and preservation**. Philadelphia: Lea & Fibiger; 1991. cap. 9, p. 167-81.
- BOLTON, L. F. & FRANK, J. F. Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. **Letters in Applied Microbiology**, 29: 350–353, 1999.
- BONNET, M. & MONTVILLE, T. J. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 237–242, 2005.
- BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**, Orlando, v.23, p.179-230, 1999.
- BOULANGE-PETERMANN, L. Process of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. **Biofouling**, Buckingham, v.5, p.21-36, 1996.
- BOULANGE-PETERMANN, L.; RAULT, J.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. **Biofouling**, Buckingham, v.11, p.201-216, 1998.
- BOWER, C. K.; MCGUIRE, J. & DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 152-157, 1996.
- CHOCT, M. Effects of Organic Acids, Prebiotics and Enzymes on Control of Necrotic Enteritis and Performance of Broiler Chickens. University of New England Armidale, NSW, 2004
- CRIADO, M.T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.2, p.123-126, 1994.

CZECHOWSKI, M.H. Gasket and stainless steel surface sanitation: environmental parameters affecting bacterial attachment. **Australian Journal of Dairy echnology**, Melbourne, p.38-39, 1990.

DAVIES, G. E.; FRANCIS, J. MARTIN, A.R.; ROSE, F. L. & SWAIN, G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 9, p. 192-196, 1954.

DENTON, G. W. **Chlorhexidine. In: Disinfection, sterilization and preservation.** Block SS. ed. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 274-289, 1991.

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

DEWANTI, R; WONG, C.M. Influence of culture conditions on biofilms formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, p.147-164, 1995.

DI MARTINO, P. et al. *Klebsiella pneumoniae* type 3 *pili* facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Research in Microbiology**, Paris, v.154, p.9-16, 2003.

DIEZ-GONZALEZ, F. & RUSSEL, J. B. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. **Microbiology**, v. 143, p. 1175-1180, 1997

DONNELLY, C.; BRACKETT, R. E. & DOORES, S. *Listeria. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. (eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3. Ed. American Public Health Association Washington. 637-663, 1992.

DRUGGAN, P.; FORSYTHE, S.J.; SILLEY, P. Indirect impedance for microbial screening in the food and beverage industries. In: **New Techniques in Food and Beverage Microbiology.** Society for Applied Bacteriology, Technical series nº 31. Oxford: Blackwell Science, 1993. p.120-125.

EKLUND, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. **Journal of Applied Bcateriology**, v. 54, p. 383-389, 1983.

FARBER, J. M. & PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FLACH, J.; KARNOPP, C; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33(3), 291-296, 2005.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar.** São Paulo: Artmed, 2002. 424p.

FRANK, J. F. & KOFFI, R. A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, v. 7, p. 550-554, 1990.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.; **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

HAEGHEBAERT, S. et al. Les toxi- infections alimentaires collectives en France en 2001. **Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire** , Paris, v.50, p.249-254, 2002.

HAYES, P. R. **Microbiologia e higiene de alimentos**, Zaragoza: Acríbia, 1993.

HEYDOM, A. et al. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell- to-cell signaling and stationary-phase a factor expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.2008-2017, 2002.

HERALD, P.J.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures an pH values. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.51, n.6, p.445-448, 1988.

HJELM, M. et al. Comparison of adhesion of the food spoilage bacterium *Shewanella putrefaciens* to stainless steel and silver surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, p.903-911, 2002.

HOLAH, J.T.; TAYLOR, J.H.; DAWSON, D.J. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent stains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Society for Applied Microbiology Symposium Series**, Bedford, v.31, p.111S-120S, 2002.

HOOD, S. K. & ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, p. 9-18, 1995.

INCZE, K. Dry Fermented Sausages. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 169–177, 1998.

JULLIEN, C. et al. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**,

KASNOWSKI, M.C. et al. Formação de biofilmes na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.8, n.15, julho 2010

KRYSINSKI, E. P.; BROWN, L. J. & MARCHISELLO, T. J. Effect of cleaners on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 246-251, 1992.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilmes in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.42, p.9-27, 1998.

LE CLERCQ-PERLAT, M.N.; LALANDE, M. Clean ability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. **Journal of Food Engineering**, California, v.23, p.501-517, 1994.

LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, London, v.11, p.179-184, 2003.

LEREBOUR, G.; CUPFERMAN, S.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v.97, p.7-16, 2004.

MARSHALL, K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society Microbiology News**, Washington, v.58, p.202-207, 1992.

MC DONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.12, p.147-179, 1999.

MC GLAUGHLIN, J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 63, p. 1-11, 1987.

METTLER, E. & CARPENTIER, B. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 57-65, 1998.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of applied Microbiology**, Northern Ireland, v.97, p.262-270, 2004.

MORELLI, A.M.F. **Escherichia coli 0157:H7:ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes**. 2008. 173 f. Tese (Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 2008.

MURIAMA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 54-63, 1996.

NASCIMENTO, M. S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras**. 2002. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002.

ORTH, D. S. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. **Journal Society of Cosmetic Chemists**, v. 30, p. 321-332, 1979.

OULAHAL-LAGSIR, N.; MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M. 'Escherichia coli – milk' biofilm removal from stainless steel surfaces: Synergism between ultrasonic waves and enzymes. **Biofouling**, Buckingham, v.19, p.159-168, 2003.

PARIZZI, S.Q.F. Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas. 1999. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D. & PELCZAR, M. F. **Microbiologia**. São Paulo: Makron Books do Brasil, Volume I, 1996.

PETERS, A.C.; ELVERS, K.T.; GRIFFITH, C.J. Biofilm in the industry: Assessing hazards and risks to health. In: WIMPENNY, J.; GILBERT, P.; WALKER, J. (Eds). **Biofilms – The good, the bad and the ugly**. Cardiff: BioLine, 1999.

PINI, P. N. & GILBERT, R. J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Properties**, v. 56, n. 7, p. 616-618, 1993.

PINTO, C. L. **Higienização na indústria de laticínio**. Juiz de Fora MG: EPAMIG/CT- MG/ Instituto Cândido Tostes, 2000.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.17, p.361-365, 2000.

PRÉSTAMO, G. & MANZANO, P. **Peroxidases of select fruits and vegetables and possible use of ascorbic acid as an antioxidant**. Hortscience, Alexandria v. 28, n.1, p. 48-50, 1993.

REN, T. J. & FRANK, J. F. Susceptibility of starved planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizer as determined by direct viable and agar plate counts. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 573-576, 1993.

RODOLFO JR., A., NUNES, L.R., ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC**. São Paulo: Proeditores/Braskem, 2002.400 p.

RONNER, A. B. & WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 750-758, 1993.

ROSSONI, E.M.M. e GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.61, p.81-85, 2000.

RYSER, E. T. & MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. University of Wisconsin, New York, 1991, 632p.

SAKURAI, A.; IMAI, H.; TAKENAKA, Y.; SAKAKIBARA, M. Simulation of citric acid production by rotating disk contactor. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v.56, p.689-696, 1997.

SINDE, E. & CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of

free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, p. 439-447, 2000.

SILVA, J. A.; SOARES L. F. & COSTA, E. L. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão - **Revista Tecnologia da Carne**. Campinas, SP, v.3, n.1, p.19-26, 2001

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**, Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995. 159p.

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

STUMBO, C. R. Bacteriological considerations relating to process evaluation. **Food Technology**, v. 2, p. 115-132, 1948a.

STUMBO, C. R. A technique for studying resistance of bacterial spores to temperatures in the higher range. **Food Technology**, v. 2, p. 228-240, 1948b.

TAYLOR, J.H.; HOLAH, J.T. A comparative evaluation with respect to the bacterial cleanability of a range of wall and floor surface materials used in the food industry. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, p.262-266, 1996.

THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; CHRISTIEANS, S. & VERNZOY-ROZAND, C. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 189–200, 2005.

TORTORA, G.J.; BERDELL, R.F.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2000. p.96-98.

TROLLER, J.A. Sanitation in food processing. 2ª ed., New York: Academic Press, 1993. 478p.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Testing guidelines for class III soft (hydrophilic) contact lens solutions (draft)**. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. 1985.

UYTTENDALE, M. R.; NEYTS, K. D.; LIPS, R. M. & DEBEVERE, J. M. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abbatoirs. **Food Microbiology**, v.14, n. 4, p. 339-345, 1997.

VALCARCE, M.B.; BUSALMEN, S.R.; SÁNCHEZ, S.R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v.50, p.61-66, 2002.

VARABIOFF, Y. Incidence of *Listeria* in small goods. **Letters in Applied Microbiology**, v.14, p. 167–169, 1992.

VERGNAUD, J.M. Problems encountered for food safety with polymer packages: chemical Exchange, recycling. **Advances in Colloid and Interface Science**, Washington, v.78, n.3, p.267-297, 1998.

WEI, C.; COOK, D.L.; KIRK, J.R. Use of chlorine compounds in food industry. *Food Technology*, New Orleans, v.39, p107-105, 1985.

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

WONG, H.; CHUNG, Y.; YU, J. Attachment and inactivation of *Vibrio arahaemolyticus* on stainless steel and glass surface. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, p.341-350, 2002.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbia I biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p.125-148, 1994.

ZOTTOLA, E.A. Special techniques for studying microbial biofilmes in food system. In: Tortorello, M.L., Gendel, S.M. **Food microbial analysis – new technologies**. IFT basic symposium series. Marcell Dekker, INC. Cap.16, p.315-346, 1997