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

DANIELE HAMANN

RASTREABILIDADE DE *Listeria monocytogenes* E REMOÇÃO DE BIOFILME EM AGULHAS DE INJETORA DE SALMOURA INDUSTRIAL

ERECHIM, RS - BRASIL
MARÇO DE 2017

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

RASTREABILIDADE DE *Listeria monocytogenes* E REMOÇÃO DE BIOFILME EM AGULHAS DE INJETORA DE SALMOURA INDUSTRIAL

DANIELE HAMANN

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL
MARÇO DE 2017

RASTREABILIDADE DE *Listeria monocytogenes* E REMOÇÃO DE BIOFILME EM AGULHAS DE INJETORA DE SALMOURA INDUSTRIAL

Daniele Hamann

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.
Comissão Julgadora:

_____

Profa. Geciane Toniazzo Backes, D.Sc.
Orientadora (URI-Erechim)

_____

Prof. Rogério Luis Cansian, D.Sc.
Orientador (URI-Erechim)

_____

Bernardo Dimer Beledelli, D.Sc.
(Aurora Alimentos-Chapecó)

_____

Profa. Eunice Valduga, D.Sc.
(URI-Erechim)

Erechim, Março de 2017.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – ERECHIM.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar sempre desafios em meu caminho e me guiar no momento das escolhas.

Agradeço a minha mãe Valnira Rossi, que sempre soube como usar das palavras e me manter motivada. Ao meu companheiro de vida, João Luiz Cuareli Alécio, que nunca mede esforços para me apoiar e aos meus familiares, que sempre acreditaram no meu potencial.

Um agradecimento especial a empresa que trabalho, em nome de Mônica Salomoni Deboni, por ter cedido o material, ter me dispensado para acompanhar as aulas e realizar as pesquisas e ter me apoiado financeira e moralmente no decorrer do mestrado.

Agradeço também aos meus orientadores Geciane Toniazzo Backes e Rogério Luis Cansian por gentilmente ter me ajudado e guiado no decorrer deste trabalho, fornecendo-me todo o suporte necessário.

Agradeço aos meus amigos e colegas da vida e da empresa que sempre torceram por mim e me ajudaram no decorrer deste período.

Um agradecimento especial a Kelli Fátima Tonkiel, aluna de iniciação científica da URI e aos demais colegas do laboratório por toda ajuda e trabalho prestado.

Dedico:

A minha família e a empresa que trabalho, por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho e me ajudar na formação.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

RASTREABILIDADE DE *Listeria monocytogenes* E REMOÇÃO DE BIOFILME EM AGULHAS DE INJETORA DE SALMOURA INDUSTRIAL

Daniele Hamann

Orientadores: Prof. Drª. Geciane Toniazzo Backes e Prof. Dr. Rogério Luis Cansian

A contaminação de alimentos apresenta um potencial de estudo devido não só ao risco a saúde, mas ao fato de ser dificilmente tratada e eliminada. Os biofilmes apresentam grande resistência ao tratamento de limpeza e sanitização, após estarem fortemente formados. O presente trabalho teve como objetivo estudar metodologias para remoção de biofilme formado por *Listeria monocytogenes* na indústria de alimentos. Com o intuito de verificar os possíveis pontos de contaminação foi realizado um rastreamento por produtos e *swab* de superfície, onde as agulhas de injeção de salmoura no setor de produtos temperados foram definidas como ponto de estudo pelo maior potencial de contaminação. Observou-se adesão de *L. monocytogenes* com formação de biofilme após 6 h de contato das agulhas com a bactéria. Em condições laboratoriais, a concentração bactericida mínima (CBM) do ácido peracético sobre biofilme de *L. monocytogenes* foi de 0,015%. Nas agulhas determinou-se CBM de 0,03 e 0,012% para biofilmes de 6 e 24 h de contato com a bactéria, com agulhas submetidas à imersão no sanitizante e de 0,06 e 0,24% para biofilmes de 6 e 24 h de contato com a bactéria, quando o sanitizante foi injetado no interior das agulhas, todos com 10 minutos de contato. A exposição das agulhas ao ultrassom propiciou uma redução da carga microbiana do biofilme de até 3,25 Log UFC/agulha com frequência de 20 KHz, 75% da potência (700w) e tempo de exposição de 14 min. A água quente (82,2 °C) foi eficaz na remoção do biofilme de *L. monocytogenes* com imersão por 30 s ou injeção por 120 s. A combinação entre o ultrassom com ácido peracético (0,3%), apresentou um redução da CBM de 0,24% para 0,03% e a higienização prévia com detergentes alcalino e ácido seguida de sanitização por injeção de ácido peracético também apresentou redução da CBM de 0,25% para 0,03%.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*, biofilmes, sanitizante, ultrassom, indústria de alimentos.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

TRACEABILITY OF *Listeria monocytogenes* AND BIOFILME REMOVAL IN INDUSTRIAL PICKLE INJECTORS NEEDLES

Daniele Hamann

Advisors: Prof. ·Drª. Geciane Toniazzo Backes and Prof. ·Dr. Rogério Luis Cansian

Food contamination presents a potential for study due not only to health risk, but to the fact that it is difficult to treat and eliminate. Biofilms exhibit high resistance to cleaning and sanitizing treatment after being strongly formed. This work aimed to study methodologies for the removal of biofilm formed by *Listeria monocytogenes* within the food industry. In order to verify the possible contamination points, a product tracking and surface swab was carried out, where the brine injection needles in the temperate products sector were defined as a point of study due to the higher contamination potential. It was observed adhesion of *L. monocytogenes* with formation of biofilm after 6 hours of contact of the needles with the bacterium. Under laboratory conditions, the minimum bactericidal concentration (MBC) of peracetic acid on *L. monocytogenes* biofilm was 0.015%. In the needles CBM of 0.03 and 0.012% was determined for biofilms of 6 and 24 hours of contact with the bacteria, with needles submitted to immersion in the sanitizer and of 0.06 and 0.24% for biofilms of 6 and 24 hours of contact with the bacteria, when the sanitizer was injected inside the needles, all with 10 minutes of contact. Exposure of the needles to ultrasound led to a reduction of the biofilm microbial load of up to 3.25 Log CFU/needle with frequency of 20 KHz, 75% of the power (700w) and exposure time of 14 minutes. Hot water (82.2 °C) was effective in removing the biofilm of *L. monocytogenes* with immersion for 30 seconds or injection for 120 seconds. The combination of ultrasound with peracetic acid showed a reduction of CBM from 0.24% to 0.03% and previous hygiene with alkaline and acid detergents followed by sanitization by peracetic acid injection also showed reduction of CBM from 0.25% to 0.03%.

Key words: *L. monocytogenes*, biofilms, sanitizers, ultrasound, food industry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise microbiológica de produto no período de janeiro a setembro de 2016, apresentando % de análise de cada produto com contaminação/análises realizadas. 26

Tabela 2: Análises de produtos divididos por setor de manipulação para *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* no período de janeiro a setembro de 2016. 27

Tabela 3: Efeito de diferentes tempos de exposição e potência do ultrassom na remoção de *L. monocytogenes* aderidas em agulhas de injeção de salmoura. 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Injetora de salmoura, cabeçote de injeção com agulhas múltiplas (a) e esteira transportadora em aço inoxidável (b). 8

Figura 2: Esquema das etapas de formação de biofilme. 9

Figura 3: Agulha de injeção de salmoura utilizada na unidade industrial em estudo. 21

Figura 4: Aparelho de ultrassom com sonda utilizado na emoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas em agulhas de injeção de salmoura. 23

Figura 5: Cinética de adesão de *Listeria monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura. 29

Figura 6: Determinação da Concentração Bactericida Mínima de ácido peracético sobre *Listeria monocytogenes*. 31

Figura 7: Determinação da Concentração Bactericida Mínima de ácido peracético sobre *Listeria monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura submetidas a imersão por 10 minutos. 32

Figura 8: Determinação da Concentração Bactericida Mínima de ácido peracético sobre *Listeria monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura submetidas a injeção do sanitizante e ação por 10 minutos. 33

Figura 9. Efeito da água quente (82,2°C) na remoção de *L. monocytogenes* aderidas em agulhas de injeção. 36

Figura 10: Efeito do método ultrassom (14 min a 75%- 20kHz) combinado com ácido peracético em diferentes concentrações, para remoção de biofilme formado por *L. monocytogenes* (24 horas de contato) em agulhas de injeção de salmoura. 38

Figura 11: Determinação da CBM de ácido peracético sobre biofilme de *L. monocytogenes* (24 horas de contato), com e sem higienização prévia com detergentes alcalino e ácido. 40

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS viii

LISTA DE FIGURAS ix

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 4

2.1. Objetivo Geral 4

2.2. Objetivos Específicos 4

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5

3.1. Qualidade da carne 5

3.2. Processo de Marinação em Carnes 7

3.3. Adesão Microbiana 8

3.4. Resistência dos micro-organismos em biofilmes 12

3.5. Ferramentas de Gestão da Segurança de Alimentos 13

3.6. Processo de Limpeza e Sanitização 14

3.7. Considerações Finais 18

4. MATERIAL E MÉTODOS 20

4.1. Rastreamento de locais de contaminação na indústria 20

4.2. Avaliação da formação de biofilmes em agulhas de injeção de salmoura 20

4.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de ácido peracético sobre *L. monocytogenes* 21

4.4. Avaliação do efeito do ultrassom na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas a agulhas de injeção 22

4.5. Avaliação do efeito de água quente na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas a agulhas de injeção 23

4.6. Efeito combinado de ultrassom e ácido peracético 23

4.7. Efeito da higienização prévia com detergentes alcalino e ácido e sanitização com ácido peracético **24**

4.8. Análises microbiológicas **24**

4.9. Análise Estatística **25**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 26

5.1 Rastreamento de locais de contaminação na indústria **26**

5.2. Adesão de *L. monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura **29**

5.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de ácido peracético sobre *L. monocytogenes* **30**

5.4. Avaliação do efeito do ultrassom na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas a agulhas de injeção **34**

5.5. Avaliação do efeito de água quente na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas a agulhas de injeção **35**

5.6. Efeito combinado de ultrassom e ácido peracético **37**

5.7. Efeito da higienização prévia com detergentes alcalino e ácido e sanitização com ácido peracético **39**

6. CONCLUSÃO 42

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 44

8. REFERÊNCIAS 45

1. INTRODUÇÃO

Por definição um alimento seguro é aquele ausente de contaminantes ou constituintes que possam causar perigo à saúde (SOUZA et al., 2005). Os alimentos podem ser inseguros por razões como: manipulação inadequada; uso de matérias primas cruas e contaminadas; contaminação e/ou crescimento microbiano; uso inadequado de aditivos químicos; adição acidental de produtos químicos; poluição ambiental e degradação de nutrientes (SOUSA, 2006).

A marinação, ou aplicação de salmoura adicionada ou não de condimentos, é um processo utilizado para melhorar as características físicas e sensoriais da carne. Consiste em submeter a carne à solução de salmoura para aumentar a retenção de fluidos e incrementar seus atributos sensoriais (RUST e KNIPE, 2014). Este processo pode ser aplicado de formas distintas, por imersão, injeção e por massageamento (dinâmico). Para o processo de injeção de salmoura são utilizadas agulhas de injeção, estas agulhas são utilizados para incorporar salmoura de cura em produtos marinados ou em pedaços de carne com a finalidade de afetar a cor do produto, textura, sabor, segurança da carne, além de proteínas, e as capacidades de ligação de água. O formato destas agulhas dependem do produto a ser injetado.

Entretanto, a higienização e sanitização do sistema de injeção e, principalmente das agulhas de injeção de salmoura, é um processo difícil em determinados equipamentos, pela dificuldade de desmontagem do mesmo para submetê-lo à sanitização completa e ou por imersão. Ao considerar a higienização do sistema de injeção, esta abrange um esfrega manual e ou com auxílio de equipamento, com detergente alcalino e após sanitização com ácido peracético, em escala industrial. Na esfrega concentra-se a remoção da matéria orgânica e após sanitização para remoção total dos micro-organismos. As agulhas de injeção devido a sua montagem no equipamento e ao seu diâmetro interno, muitas vezes, é higienizada somente através do sistema de arraste por pressão do próprio sistema. Este ponto é um potencial formador de biofilme, devido à dificuldade de remoção total da material orgânica, e ao fato de a sanitização não abranger toda a superfície interna à agulha.

Os produtos temperados, produzidos na indústria estudada, passam pela etapa de injeção de salmoura, tanto em etapa intermediaria como em etapas iniciais. Devido ao sistema de injeção ser formado/montado por blocos de agulhas e as agulhas apresentarem diâmetro extremamente pequenos, a etapa de injeção passa a ser um ponto de controle microbiológico e de estudo, para otimização do sistema de higiene e sanitização, devido a facilidade em geral

uma contaminação cruzada dentro da indústria, pois o equipamento é utilizado para temperar um série de produtos.

Biofilme o qual é caracterizado como a biomassa acumulada de micro-organismos e materiais extracelulares sobre uma superfície sólida, pode ser prejudicial para ambos os processos vitais e industriais humanos (HORI e MATSUMOTO, 2010; BAN e KANG, 2015). Segundo Winkelstroter (2012) biofilme pode ser definido como uma comunidade de células bacterianas embutidas em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) produzidas pelas próprias células aderidas em uma superfície abiótica ou biótica. A questão relacionada à formação de biofilme deve-se ao fato que as células apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos e detergentes do que quando livres. Esta resistência pode estar relacionada com limitações à passagem pela matriz extracelular, devido a alterações fenotípicas das células na estrutura do biofilme e ao mecanismo de resistência gerado pela estrutura tridimensional. Estudos mostram que as operações de lavagem e sanitização utilizados pelas indústrias alimentícias nem sempre garantem a eliminação completa dos biofilmes (GOMES, 2011; MALHEIRO e SIMÕES, 2017). As células aderidas são altamente resistentes aos ácidos presentes na desinfecção, com tolerância ou resistência a concentrações letais de desinfetantes, porque produzem exopolissacarídeos que protegem contra agentes químicos (CARPENTIER e CERF, 1993; SILVA et al., 2010).

A *Listeria*. *monocytogenes* pode persistir em equipamentos industriais e instalações com alto potencial de adesão e capacidade de formação de biofilme a baixas temperaturas (CARPENTIER e CERF, 1993). A aderência bacteriana à superfícies de aço inoxidável, vidro, e polipropileno é uma fonte potencial de contaminação que pode levar à transmissão desta doença (CHAVANT et al., 2007). Entre as diversas DTAs (doenças transmitidas por alimentos), uma das mais importantes é a listeriose, causada por *Listeria monocytogenes*, devido ao seu grau de sequelas e alto índice de letalidade (20 a 30%) (BAN e KANG, 2015).

O ácido peracético é um excelente sanitizante contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus e esporos bacterianos, pois não somente atacam as proteínas da parede celular, mas também migram para dentro da célula, rompendo componentes internos desta (MCDONNELL e RUSSELL, 1999). Entretanto, requer contato direto com o micro-organismo por um determinado período de tempo para ser eficaz, o qual varia em função da concentração do mesmo.

Outro método amplamente investigada por causar inativação celular bacteriana é o processo de ultrassom, por ser responsável por causar um afinamento das paredes celulares de bactérias, tornando-as mais suscetíveis à ruptura. Na indústria alimentar, o ultrassom é visto

como uma ferramenta em potencial para o processamento de alimentos, que pode ser usado em combinação com outros tratamentos, tais como o calor e produtos químicos, para inativar bactérias (BETTS et al., 2014).

O ultrassom apresenta o efeito de cavitação, que é a formação de cavidades ou bolhas no meio líquido, gerando certa quantidade de gás, que pode acarretar mudança estrutural ou funcional das células devido ao rompimento de ligações moleculares (DOMINGOS, 1998), e a energia gerada resultará na liberação dos micro-organismos dos biofilmes (JAY, 2005). As propriedades hidrodinâmicas do ultrassom desestabilizam a estrutura do biofilme e, quanto maior a intensidade e o tempo de exposição, maior é a quebra do biofilme (SCHERBA et al., 1991).

Devido aos riscos inerentes a ocorrência de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos, existe a necessidade de conhecer e mapear os locais mais propícios a aderência microbiana e propor metodologias eficazes de eliminação de biofilmes e células contaminantes para evitar contaminações cruzadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a remoção de *L. monocytogenes* previamente aderida na parte interna de agulhas de injeção de salmoura de indústria de alimentos.

2.2. Objetivos Específicos

- Rastrear os possíveis pontos de contaminação microbiana em uma indústria de produtos cárneos de grande porte;

- Avaliar a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* e em agulhas de injeção de salmoura;

- Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) de ácido peracético sobre *L. monocytogenes* previamente aderidas em agulhas de injeção de salmoura sob condições laboratoriais e da parte interna das agulhas, simulando o processo de aplicação realizado na indústria;

- Avaliar o efeito do ultrassom na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas em agulhas de injeção de salmoura;

- Avaliar o efeito de água quente (82 °C) na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas em agulhas de injeção de salmoura;

- Avaliar o efeito combinado do ultrassom e ácido peracético sobre *L. monocytogenes* previamente aderidas em agulhas de injeção de salmoura sob condições industriais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Qualidade da carne

O conceito de qualidade de alimentos permite avaliar e aprovar, aceitar ou recusar determinado tipo de produto. A segurança de um alimento, é garantir que o consumo não cause danos aos consumidores, quando preparado ou consumido de acordo com seu uso intencional (CODEX ALIMENTARIUS, 1999). A microbiota de um alimento é constituída por micro-organismos associados à matéria prima e/ou por contaminantes, adquiridos durante o beneficiamento, manuseio, processamento, acondicionamento, distribuição e/ou preparo para o consumo (manipuladores) dos alimentos. Os micro-organismos capazes de sobreviver ao processamento podem contaminar os alimentos (LIMA e SOUSA, 2002), podendo estes tornarem-se alterados (com perda das características organolépticas próprias e de seu valor comercial) e até ocasionar, no consumidor, infecções e intoxicações alimentares, dependendo do seu nível de contaminação microbiana e de suas características (SOUZA, 2006; BAN e KANG, 2015).

As doenças transmitidas por alimentos cobrem uma ampla gama de doenças e são desencadeadas por agentes que foram consumidos juntamente com os alimentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer fase do processo, desde a produção de alimentos até o consumo e pode resultar da contaminação ambiental, incluindo a poluição da água e do ar (SREY et al., 2013). Segundo a OMS, eles são considerados um problema de saúde pública emergente em ambos os países desenvolvidos e em desenvolvimento (SREY et al., 2013 apud OMS, 2007). Muitos surtos de patógenos podem ser associados com biofilmes (SREY et al, 2013). A abertura do mercado interno ao comercio internacional, condicionam as indústrias a atingirem patamares mais elevados de flexibilização e especialização, direcionados para o atendimento ao cliente. A priorização das estratégias da gestão da qualidade é promover melhorias contínuas no seu processo produtivo. A higienização em um indústria de alimentos merece um destaque especial, pois gera uma reação em cadeia, empresas que se preocupam com a qualidade, diminuem custos, melhoram sua posição competitiva, possuem pessoas mais felizes no trabalho, menos retrabalho e desperdícios (BERTHIER, 2007; THRUN, 2003).

As análises microbiológicas dos equipamentos permitem uma avaliação objetiva do seu estado higiênico, das práticas sanitárias e procedimentos de limpeza adotados em indústrias de alimentos (FAVERO et al., 1984). Padrões microbiológicos atuais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001) não fazem referência à quantidade de micro-organismos mesófilos, nem de coliformes, ou qualquer outro micro-organismo para superfície de equipamentos. Já o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2002), utilizam os padrões microbiológicos contidos na legislação do Mercado Comum Europeu, que estabelece um limite inaceitável acima de 10 UFC por cm^2 de bactérias mesófilas e acima de 1 UFC por cm^2 de *Enterobacteriaceae* nos testes de superfície de equipamentos, porém sem especificar os utensílios de operadores.

Além das análises dos equipamentos, outro método utilizado para monitorar se as condições higiênicas estão adequadas, é realizar análise microbiológica dos alimentos que são produzidos neste ambiente. Alguns micro-organismos monitorados são denominados micro-organismos indicadores, pois quando presentes podem fornecer informações sobre o nível de adequação de cada etapa do processo, pois através deles pode-se identificar qual etapa do processo está inadequado e qual medida deve ser tomada no sentido de prevenir contaminações (FERRARI, 2013).

Atualmente a bactéria *Listeria* sp., devido à incidência e patogenicidade na indústria de alimentos, é muito avaliada e estudada. À sua natureza ubíqua a torna uma preocupação para a indústria de alimentos. Possui uma capacidade muito grande em formar biofilme e este pode ser o principal fator na contaminação alimentar (POIMENIDOU et al., 2016).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, apresenta forma de cocobacilo, é móvel devido à presença de flagelos e é anaeróbia facultativa. O pH ótimo de crescimento é entre 25 e 30 ºC e adapta-se a baixas temperaturas (2-4 ºC). Pode estar presente e crescer em alimentos ácidos e de alta concentração salina, sendo encontrada em uma grande variedade de alimentos, especialmente alimentos crus (GOMES, 2011). Sua alta resistência está baseada na sua capacidade de formar biofilme em materiais como aço inoxidável, plásticos e superfície de policarbonato (KONEMAN et al., apud CATÃO, 2001; GOMES, 2011; CHMIELEWSKI e FRANK, 2006).

Com relação a *Listeria monocytogenes*, o MAPA passou a exigir através da CIRCULAR Nº354/2004/DCI/DIPOA (BRASIL, 2004), procedimentos para a prevenção do micro-organismo apenas em produtos prontos, e através da CIRCULAR Nº 105/05/CGPE/DIPOA (BRASIL, 2005), o controle passou a ser exigido não somente no produto final, como também em *swabs* de

superfícies, embora apenas para indústrias exportadoras para os Estados Unidos (BARBOSA et al., 2016).

Henriques et al. (2016) realizando estudos com *L. monocytogenes* identificaram presença do micro-organismos em 18% das amostras de carne de frigorifico de alimentos, destacando a necessidade da melhoria no sistema de gestão de limpeza e sanitização das instalações industriais, baseados em casos de virulência.

3.2. Processo de Marinação em Carnes

A marinação, ou aplicação de salmoura adicionada ou não de condimentos, é um processo utilizado para melhorar as características físicas e sensoriais da carne. Consiste em submeter a carne à solução de salmoura para aumentar a retenção de fluidos e incrementar seus atributos sensoriais (RUST e KNIPE, 2014).

Este processo pode ser aplicado de formas distintas, por imersão, injeção e por massageamento (dinâmico). A imersão consiste em imergir a carne em solução por um tempo determinado, até que os ingredientes penetrem por difusão no produto, sem aplicação de forças adicionais (FERREIRA, 2011).

Por injeção utiliza-se equipamento, conhecido como injetora de salmoura, este equipamento é composto por uma esteira transportadora, com dentes que prende o produto, deslocando-o até as agulhas, jogo de agulhas ocas e perfuradas, ligadas a um sistema de bombeamento que transportam a solução a ser injetada (Figura 1). Esta solução encontra-se em reservatório conectado ao sistema e é previamente preparada com ingredientes selecionados, bem como concentrações adequadas ao produto e às características sensoriais desejadas. Neste processo, a absorção da solução é através da pressão gerada pela penetração da agulha no produto e pela velocidade da esteira (RUST e KNIPE, 2014; FERREIRA, 2011).

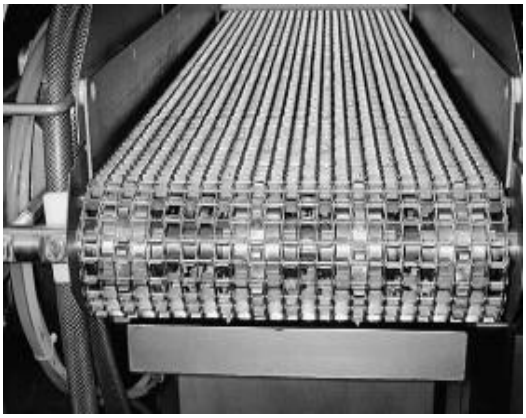
Para o processo de injeção de salmoura são utilizadas agulhas de injeção para incorporar salmoura de cura em produtos marinados ou em pedaços de carne com a finalidade de afetar a cor do produto, textura, sabor, segurança da carne, além de proteínas, e as capacidades de ligação de água. O formato destas agulhas dependem do produto a ser injetado. Para a injeção de Bacon são utilizadas agulhas com furos na extremidade, no entanto, as agulhas destinadas a produtos onde o corte envolve músculos inteiros, a agulha utilizada geralmente apresenta aberturas laterais para que a solução seja injetada em direções múltiplas, com melhor distribuição e retenção da salmoura. Quanto menor o diâmetro das aberturas, menor será a injeção, usadas para produtos que exigem menor nível de absorção. É

aconselhável a utilização de agulhas com os menores diâmetros externos possíveis para reduzir marcas de agulha no produto a ser bombeado. No entanto, o diâmetro interno deve ser suficiente para evitar a necessidade de pressões excessivas de bombeamento para proporcionar o volume apropriado de salmoura (RUST e KNIPE, 2014).

O processo de massageamento é realizado em *tumblers*, tambores metálicos giratórios, no qual a carne está em contato direto com a solução de salmoura, aumentando a incorporação dos ingredientes pela carne (FERREIRA, 2011).

Figura 1: Injetora de salmoura, cabeçote de injeção com agulhas múltiplas (a) e esteira transportadora em aço inoxidável (b).

(a)



(b)

Fonte: Rust e Knipe (2014).

3.3. Adesão Microbiana

Segundo Hori e Matsumoto (2010), a adesão bacteriana pode ser descrita por duas abordagens físico-químicas distintas, a teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) e a abordagem termodinâmica. A teoria DLVO descreve a interação de uma partícula coloidal com uma superfície através de forças de Van der Waals e interações de Coulomb irreversíveis, devido o processo de ligação ser predominante sobre forças brownianas. Com base na teoria DLVO, a adesão bacteriana tem sido descrita como um processo de duas fases que inclui uma fase física inicial, instantânea e reversível e uma irreversível molecular e celular (HORI e MATSUMOTO, 2010).

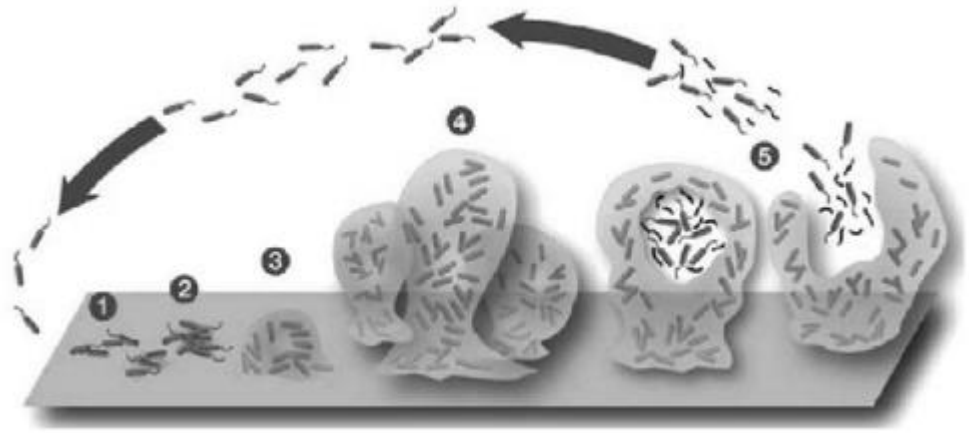
A abordagem termodinâmica ajuda a explicar uma observação comum, onde as bactérias com uma superfície celular hidrofóbica preferem superfícies de materiais hidrofóbicos; aqueles com uma superfície celular hidrofílica preferem superfícies hidrofílicas.

Com isso a adesão ocorre devido a compatibilidade entre cargas da bactéria e da superfície e a interação hidrofóbica entre os dois radicais apolares imersos em água é a única consequência das ligações por ponte de hidrogênio formadas entre eles (HORI e MATSUMOTO, 2010).

No primeiro passo da adesão celular, uma célula bacteriana chega próximo a superfície devido a sua mobilidade e aos movimentos Brownianos e adere à superfície de forma reversível (HORI e MATSUMOTO, 2010; DRAGO e TOSCANO, 2017). Esta adesão inicial é dependente de fatores físicos-químicos como força de atração e repulsão, hidrofobicidade e características da célula microbiana (WINKELSTROTER, 2012; FERREIRA, et al., 2010). O processo inicial de adesão da bactéria pode ser ativo ou passivo. Ou seja dirigido pela gravidade, difusão e dinâmica dos fluidos, ou com a atuação celular como flagelo, pili, cápsula e cargas da superfície (GOMES, 2011).

Após a adesão, que pode ser dificultada devido a energia eletrostática repulsiva gerada pela sobreposição de camadas dupla elétricas entre célula bacterianas e o substrato que encontram-se carregadas negativamente em solução, a bactéria utiliza nanofibras tais como os pili e flagelos, ou produz substâncias exopoliméricas (EPS), que podem perfurar a barreira de energia (a qual dificulta a adesão), para estabelecer a ligação entre a célula e a superfície de forma irreversível (HORI e MATSUMOTO, 2010). Em seguida o biofilme passa por processo de crescimento, maturação e dispersão (Figura 2) (WINKELSTROTER, 2012).

Figura 2: Esquema das etapas de formação de biofilme.



1) adesão inicial das células bacterianas na superfície, 2) EPS é produzido e adesão se torna irreversível, 3 e 4) a arquitetura do biofilme se desenvolve e amadurece e 5) as células são dispersas do biofilme (Fonte: WINKELSTROTER, 2012).

Nesta etapa de adesão irreversível da bactéria, inicia-se a produção de material polimérico extracelular (MPE) e as forças atuantes neste estágio incluem ligações covalentes e ligações de hidrogênio o que torna a adesão do micro-organismo irreversível, e assim, sua remoção por métodos químicos e físicos mais complexa (GOMES, 2011). Na terceira etapa as células passam por um processo de agregação e crescimento dos micro-organismos acompanhado pela produção de EPS e na etapa de maturação apresenta uma estrutura complexa com áreas densas, poros e canais formando uma arquitetura tridimensional (GOMES, 2011; FLEMMING e WINGENDER, 2010; O'TOOLE e KOLTER, 1998). Na etapa de dispersão ocorre a liberação de células planctônicas ou de microcolônias, ocorrendo disseminação da contaminação, preocupante para a indústria alimentícia, pois essas células podem causar deterioração, perda de qualidade ou veiculação de doenças em produtos alimentícios (GOMES, 2011; BOLES et al., 2005).

Biofilme o qual é caracterizado como a biomassa acumulada de micro-organismos e materiais extracelulares sobre uma superfície sólida, pode ser prejudicial para ambos os processos vitais e industriais humanos (HORI e MATSUMOTO, 2010; BAN e KANG, 2015). Segundo Winkelstroter (2012) biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de células bacterianas embutidas em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) produzidas pelas próprias células aderidas em uma superfície abióticas ou bióticas.

Segundo Hori e Matsumoto (2010), uma superfície bacteriana é estruturalmente e quimicamente heterogênea. As bactérias Gram-negativas têm uma membrana exterior constituída por uma bicamada lipídica que contém lipopolissacarídeos na camada externa. Já as nanofibras bacterianas são responsáveis não apenas por perfurar a barreira de energia descrita pela teoria DLVO, mas também por fazer com que ocorra um desvio do comportamento de adesão da célula do que o prevista pela teoria DLVO, na qual a parte hidrofóbica localizada a uma nanofibras bacteriana adere a superfície celular hidrofílica, atuando na interface do biofilme. Essa estrutura celular afeta diretamente a adesão dos micro-organismos às superfícies sólidas. EPS e apêndices celulares protéicos têm funções de ligação entre o corpo celular e um substrato. Enquanto EPS é importante para o desenvolvimento da estrutura do biofilme, os apêndices celulares protéicos são muitas vezes essencial para a interação inicial entre as células e um substrato, pois atuam como a adesina.

A matriz dos biofilmes pode ser formada por polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e DNA extracelular e DNA extracelular (eDNA) (PERRY et al., 2009; PETERSEN et al., 2005). O eDNA exerce uma função muito importante no crescimento do biofilme, pois pode estar relacionado com substrato fornecido para as células

adjacentes, bem como ajuda na manutenção da estrutura tridimensional do biofilme e na troca de material genético (VILAIN et al., 2009).

Lipopolissacarídeos

Os lipopolissacarídeos são compostos de lipídio A, de um núcleo lipopolissacarídeos e de uma região mais externa de unidades de antígeno S. Eles são importantes para a aderência inicial da superfície bacteriana, a ligação entre os LPS e a superfície é de aproximadamente 20 nm assumido que a ligação entre eles é através de pontes de hidrogênio (HORI e MATSUMOTO, 2010).

Exopolissacarídeos

EPS são classificados em: vinculados- fortemente ligadas- polímero capsular e fracamente ligados- lodo, solúveis- polímeros liberados na água bruta. A produção de EPS é associada à estrutura do biofilme, pois proporciona o suporte estrutural para o biofilme. Cinquenta a noventa por cento do carbono orgânico total presente no biofilmes é devido aos EPS, considerado como o material de matriz primária dos biofilmes. Os EPS são compostos por polissacarídeos primários e outras macromoléculas, tais como proteínas, DNA, lipídios e substâncias húmicas. As interações entre os EPS e a superfícies são causados por ligações não covalentes, tais como atração e ligações de pontes de hidrogênio eletrostáticas (HORI e MATSUMOTO, 2010).

Nanofibras bacterianas

Algumas bactérias têm apêndices filamentosos celulares, que apresentam diâmetro em dezenas de nanómetros e centenas a milhares de nanômetros de comprimento, flagelos e pili. Estas nanofibras bacterianas têm sido mostradas para funcionar como adesina. Algumas nanofibras bacterianas mediam a adesão celular à superfícies abióticas e estão envolvidas na formação do biofilme. Outras ligam-se especificamente a biomoléculas sobre as células hospedeiras e/ou matrizes extracelulares, tais como o colágeno e a fibronetina.

Pili são complexos constituídos de diversos tipos de subunidades de proteína, sendo dispostos em formato de hélice para formar um corpo alongado em forma de vareta. A ponta de um pili contém várias proteínas diferentes cobertas por adesina. Existem vários tipos de pili, as quais variam em função, estrutura molecular, localização na superfície de uma célula e os mecanismos de secreção e montagem. Uma célula bacteriana tem frequentemente mais do que um tipo de pili (HORI e MATSUMOTO, 2010).

Adesina auto transportadora

Outra classe atuante na formação e estruturação de biofilmese são as adesinas auto transportadoras. Diferente das fímbrias, elas são pequenas nanofibras monoméricas ou oligoméricas observadas em bactérias Gram-negativas. A designação "Auto transportadora" vem a partir do mecanismo de translocação conhecido como o sistema de secreção de tipo V, que é um dos sistemas de secreção mais amplamente distribuído entre bactérias Gram-negativas. Neste sistema, as proteínas são secretadas para fora das células sem a mediação de outras proteínas. Após a sua secreção para o periplasma através da membrana interna pelo sistema Sec-dependente e procissão de um péptido de sinal N-terminal, o domínio translocador C-terminal é inserido na membrana externa e forma uma estrutura β de barril, para formar um poro. Subsequentemente, um domínio interno de passagem é segregado a partir do periplasma para a superfície celular através do poro (HORI e MATSUMOTO, 2010).

3.4. Resistência dos micro-organismos em biofilmes

A questão relacionada à formação de biofilme deve-se ao fato que as células apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos e detergentes do que quando livres (GOMES, 2011; MALHEIRO e SIMÕES, 2017). Segundo os autores, essa resistência pode estar relacionada com limitações à passagem pela matriz extracelular, devido a alterações fenotípicas das células na estrutura do biofilme e ao mecanismo de resistência gerado pela estrutura tridimensional.

As propriedades superficiais também desempenham um papel importante na adesão bacteriana. Geralmente, qualquer superfície é vulnerável ao desenvolvimento de biofilme, incluindo plástico, vidro, metal, madeira e produtos alimentares. A aderência à superfície também depende das propriedades físico-químicas da superfície, tais como a textura (áspera ou lisa), a carga superficial, pH, temperatura, e a composição nutriente da solução de pré-condicionamento (SREY et al: 2013).

Estudos mostram que as operações de lavagem e sanitização utilizados pelas indústrias alimentícias nem sempre garantem a eliminação completa dos biofilmes, devido principalmente as condições dos materiais, os quais ajudam na aderência e formação dos biofilmes como rugosidades, rachaduras e “zonas mortas” (de baixo fluxo) (GOMES, 2011).

Outra forma de resistência é a presença de biofilmes mistos, contendo duas ou mais espécies interagindo entre si, as quais favorecem uma a outra, tornando os biofilmes mais

estáveis em ambientes desfavoráveis do que biofilmes formados por apenas uma espécie de micro-organismo (GOMES, 2011; MALHEIRO e SIMÕES, 2017).

As cepas de *L. monocytogenes* podem persistir no ambiente de processamento de alimentos por extensos períodos, facilitando a formação de biofilme (WINKELSTROTER, 2012), o qual apresenta uma correlação positiva entre a resistência do biofilme e a biomassa de biofilmes (WANG et al, 2017). Algumas estirpes são capazes de se adaptar a ambientes hostis e desenvolver um mecanismos de resistência, facilitando a permanência na indústria de processamento de alimentos durante vários anos (POIMENIDOU et al., 2016).

Estirpes de *L. monocytogenes* podem também apresentar diferenças na sua tolerância aos desinfetantes, afetando a segurança na manipulação, fazendo com que a correlação entre a persistência nas plantas fabris de alimentos e a sua capacidade de formação de biofilme e/ou resistência à desinfecção estejam em constante estudo (POIMENIDOU et al., 2016).

3.5. Ferramentas de Gestão da Segurança de Alimentos

O Codex Alimentarius é um fórum internacional de normalização de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas por meio da Food and Agriculture Organization- FAO e Organização Mundial da Saúde-OMS, criado em 1963, com a finalidade de proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas de comercio regional e internacional de alimentos (BRASIL, 2006).

Os padrões de segurança alimentar são definidos no acordo para Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitosanitárias- SPS da Organização Mundial do Comércio-OMC como aquelas relacionadas com os aditivos alimentares, as drogas veterinparias e resíduos de pesticidas, os contaminantes, os métodos de análise e de amostragem e os códigos e manuais de Práticas de Higiene. Esses padrões são usados como referência pela OMC (SENAI, 2000).

A higiene dos alimentos representa a maior atividade do CODEX desde o estabelecimento do Comitê do Codex Alimentarius- CCA. A higiene dos alimentos é mais bem controlada na etapa de produção e processamento, sendo o objetivo o estudo das Práticas Higiênicas, então em 1997, o Codex adotou a aplicação do sistema de Análise de perigos e Pontos Críticos de Controle, o APPCC, como ferramenta importante para identificar perigos e estabelecer um esquema de controle. A prevenção é a base da norma (BERTHIER, 2007 (CNC/CNI/SEBRAE/ANVISA, 2000).

O Sistema de APPCC é recomendado por organismos internacionais como OMC, FAO, OMS e pelo MERCOSUL e é exigido pela Comunidade Européia e pelos Estados Unidos. No Brasil, o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura e Abastecimento já

têm ações com objetivo de adoção do Sistema APPCC pelas Indústrias Alimentícias (BERTHIER, 2007; BRASIL, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA participa do projeto APPCC, desenvolvido para garantir a produção de alimentos seguros à saúde do consumidor (BERTHIER, 2007; BRASIL, 2006). Uma das ações do projeto é a criação do Sistema APPCC, que tem como pré-requisitos as Boas Práticas de Fabricação e a Resolução RDC número 275, de 21 de outubro de 2002 sobre Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO).

3.6. Processo de Limpeza e Sanitização

A implementação de um sistema que garanta a segurança alimentar implica o cumprimento dos requisitos à limpeza e sanitização. . A limpeza é um processo que tem como objetivo a separação e desprendimento de todo tipo de sujidade aderidas às superfícies, objetos e utensílios e a posterior eliminação da solução detergente utilizada, durante o enxague final. Este processo físico é a primeira etapa do processo de higienização. Nesta primeira etapa não ocorre a remoção total dos micro-organismos, porém um parte considerável de células é removida. As bactérias após a formação de um biofilme não é eliminada nesta primeira etapa, caracterizando a necessidade da aplicação de um sanitizante seguido a limpeza-esfrega (BAPTISTA, 2003).

Uma série de sanitizantes com diferentes propriedades e área de utilização estão presentes no mercado atual. Porém deve-se observar a aplicação específica, muitos métodos são eficazes para testar o efeito antimicrobiano do desinfetante, o método escolhido deve ser o que mais caracteriza a situação real (MORETRO et al., 2012; YANG, FEIRTAG e DIEZ-GONZALEZ., 2013; BAN e KANG, 2015).

A sanitização é definida como o tratamento de superfícies/equipamentos usando-se métodos físicos ou químicos, tais que a quantidade de micro-organismos presentes é reduzida a números aceitáveis (ASSELT e GIFFEL, 2005). 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 toxidade e corrosividade (ANDRADE et al., 2008). Além disso, devem ser atóxicos, hipoalergênicos e não inflamáveis, não devem ter impacto negativo sobre o material de superfície como: não ser corrosivo, não alterar a coloração e não reagir com a superfície, ser estável durante o armazenamento e apresentar estabilidade frente a uma ampla faixa de pH e

temperatura, não ser contaminante e ter uma boa faixa de atividade (MORETRO et al., 2012; ANDRADE et al., 2008).

Um dos principais agentes sanitizantes é o cloro, este possui um largo espectro de atividade, atua rapidamente e é geralmente mais barato. É, em geral, mais eficaz a valores de pH mais baixos, mas, devido à formação de cloro gasoso, pode ser tóxico e apresentar pontos de corrosão. Frequentemente utilizado a pH alcalino. Desinfetantes que contêm peróxido de hidrogênio ou ácido peracético são ambientalmente indicados, porque se decompõem em oxigênio e ou água (ou o ácido acético). Eles têm um largo espectro de atividade e reagem rapidamente. O ácido peracético é relativamente estável na presença de compostos orgânicos em comparação com outros tipos de sanitizantes. Sanitizantes à base de tensoativos, tais como compostos de amônia quaternária são amplamente utilizados na indústria alimentar. Eles são ativos contra uma gama de bactérias vegetativas e pode ser utilizado em uma longa faixa de temperatura. Sanitizantes à base de álcoois são eficazes contra uma grande variedade de micro-organismos, é relativamente robusto atuando na presença de material orgânico. No entanto, seu uso é limitado devido a razões de segurança e o preço é relativamente elevado. Álcoois são, portanto, utilizados principalmente para a desinfecção das mãos e em equipamentos secos (MORETRO et al., 2012).

Apesar de que a sanitização foi definida como a redução do número de bactérias viáveis, o efeito da desinfecção é frequentemente testado medindo a concentração inibitória mínima (MIC) para o crescimento. Neste método, a bactéria alvo é exposta ao desinfetante em suspensão em nutriente com diferentes concentrações, e o crescimento é determinado após incubação durante um tempo específico identificando-se a menor concentração capaz de inibir o crescimento (MORETRO et al., 2012). Já, a concentração bactericida mínima é definida como a menor concentração que não permite o crescimento do micro-organismo exposto ao sanitizante por um determinado tempo e reinoculado em subcultivo (ALMEIDA et al., 2016).

Quatro principais fatores influenciam o efeito dos sanitizantes: concentração, temperatura, tempo de exposição e a presença de material orgânico. A falha na limpeza antes da desinfecção impacta de forma muito enfática sobre o processo de desinfecção, pois o efeito da maioria dos sanitizantes é reduzida na presença de material orgânico. Além disso, a fase de crescimento das bactérias irá influenciar a sensibilidade da bactéria em relação ao desinfetantes. Sabe-se que as bactérias em fase exponencial de crescimento são mais sensíveis aos desinfetantes que as bactérias em fase estacionária (MORETRO et al., 2012).

3.6.1. Ácido Peracético

O peróxido do ácido acético, chamado de ácido peroxiacético ou peracético, é produzido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com peróxido de hidrogênio na presença de ácido sulfúrico como catalisador (KITIS, 2004).

É um agente antimicrobiano mais eficiente do que o peróxido de hidrogênio sendo ativo contra um grande espectro de micro-organismos. É esporicida em baixas temperaturas e permanece ativo na presença de matéria orgânica. O ácido peracético não somente ataca as proteínas da parede celular, mas também migra dentro da célula, e da mesma forma, rompe componentes internos da célula (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

Dentre as vantagens do ácido peracético, verifica-se que é um excelente sanitizante contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus esporos bacterianos. O APA apresenta facilidade de implementação de tratamento; largo espectro de atividade, mesmo na presença de matéria orgânica heterogênea; ausência de residual ou subprodutos tóxicos e, ou, mutagênicos; desnecessária descloração; baixa dependência do pH; curto tempo de contato; baixo impacto ambiental e tem sido o mais ativo contra os biofilmes (SOUZA e DANIEL, 2005).

3.6.2. Ultrassom

Para Lin e Zhang (2000), o ultrassom com alta potência (em torno de frequência de 3MHz) é um meio tradicional de várias aplicações e que durante décadas passadas vem sendo utilizado na indústria eletrônica e em outros diferentes campos. Tem-se dado atenção a algumas aplicações como limpeza ultrassônica, soldagem ultrassônica de plásticos, avaliação da qualidade de metais fundidos, assim como para novas aplicações do ultrassom alta potência, como química de ultrassom e terapia ultrassônica. No caso da energia de aplicação do ultrassom de alta potência, as características de vibração do transdutor usado são essenciais para modelo e segurança de trabalho do sistema vibracional. A medida das características vibracionais do transdutor é importante para avaliação da sua performance, assim como do processo prático do transdutor utilizado.

Além disso, Barbosa e Serra (1992), citam que no processo de cavitação gerado por ondas de ultrassom pode haver formação de dois tipos de bolhas:

- Bolhas de cavitação estáveis: que oscilam periodicamente no meio e possuem tempo de vida longa de alguns ciclos. Seu volume cresce por penetração de gás dissolvido no meio quando na fase de descompressão. Se atingirem uma dimensão crítica podem tornar-se transitórias;

- Bolhas de cavitação transitórias: possuem tempo de vida curto de poucos ciclos. Seu volume cresce por penetração do gás dissolvido na fase de descompressão, quando alcançam uma dimensão crítica. São as responsáveis pela cavitação. No momento da implosão das bolhas há formação de ondas de choque e na fase final esperam-se no centro da bolha, temperatura e pressão muito elevadas da ordem de aproximadamente 10.000K e 1000 atm.

Ultrassom é uma técnica bem conhecida e usada em vários processos industriais de alimentos ou seja congelação, corte, secagem, endurecimento, de branqueamento, esterilização, e de extração (SREY; et al, 2013). Foi relatado também ser utilizado como um método eficaz de remoção de biofilme (OULAHAL-LAGSIR, MARTIAL-GROS, BOISTIER, BLUM, e BONNEAU, 2000ª apud SREY et al., 2013).

O potencial do ultrassom foi demonstrado pela primeira vez dentro da indústria alimentar quando foi descoberto que o sonar usado na guerra antissubmarino estava matando peixes nas proximidades. Depois disso, deu-se início a pesquisa com ultrassons como um método para inativação de células.

Na década de 1960, a pesquisa concentrou-se na compreensão dos mecanismos pelos quais o ultrassom interagiram com células microbianas, relacionados aos efeitos do fenômeno de cavitação e ruptura de cisalhamento associados ao aquecimento localizado e formação de radicais livres. Na década de 1970, descobriu-se que uma breve exposição ao ultrassom causou um afinamento das paredes celulares de bactérias, tornando-as mais suscetíveis à ruptura. Em tempos mais recentes, a aplicação de ultrassom tem sido amplamente investigada pelo seu potencial para causar inativação celular bacteriana. Na indústria alimentar, o ultrassom é visto como uma ferramenta em potencial para o processamento de alimentos, que pode ser usado em combinação com outros tratamentos, tais como o calor e produtos químicos, para inativar bactérias (BETTS et al., 2014).

Segundo Phull et al. (1997), o ultrassom pode ser usado de forma eficaz para a desinfecção da água e tem várias vantagens, quando usado em conjunto com o cloro reduz significativamente o número de bactérias presentes, sendo que o aumento da potência de ultrassom leva a uma maior eficiência na destruição de células bacterianas. Porém Erriu et al. (2014), relataram que, dependendo da potência e tempo de utilização do equipamento, este pode ser eficaz para remoção ou um potencial para formação de biofilmes microbianos.

Ultrassom, por ser um método não térmico de conservação de alimentos que tem a vantagem de inativar micróbios em alimentos líquidos com danos celulares, sem causar os efeitos colaterais mais comuns associados com os tratamentos de calor convencionais, tais como a perda de nutrientes e sabor (CAMERON et al., 2008).

3.6.3. Água Quente

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Circular 175/2005 (BRASIL, 2005), determina que a higienização dos instrumentos de trabalho será precedida de lavagem dos mesmos e far-se-á em esterilizadores com temperatura mínima de 82,2 ºC (180 ºF), por um tempo mínimo de 15 segundos.

Autores como Ukuku (2006) relatam que o tratamento com água quente reduziu as populações microbianas na superfície do melão em 4,9 log enquanto H_2O_2 ou cloro causou uma redução de aproximadamente 2,6 unidade de log.

Trabalhos citam também que com o tratamento de água quente ocorrem diminuições significativas nos números de *Campylobacter termófilos* em amostras de pele de frango artificialmente contaminados, em tempo de 10 segundo de imersão em água mantida a 75°C, 80°C ou 85°C ($P \leqslant 0.05$). Imersão por 20 segundos em água a 80°C e 85°C resultou em reduções significativas do total de bactérias viáveis de *Enterobacteriaceae* e *Campylobacter* ($P \leqslant 0.05$). Ocorre também reduções estatisticamente significativas nas contagens de bactérias viáveis totais de *Enterobacteriaceae* e *Campylobacter termófilos* observados em carcaças de frangos expostas a vapor atmosférico a 90°C durante 12 s, quando comparado com as carcaças de controle não tratadas (WHYTE et al., 2003).

3.7. Considerações Finais

Considera-se um assunto atual e constantemente discutido e estudado o mapeamento de todos os pontos potenciais à formação de biofilme dentro da indústria de alimentos, devido a capacidade do biofilme em resistir ao tratamento de higienização e sanitização, bem como o potencial risco a saúde humana. Devido ao grande número de relatos de contaminação direta e cruzada dentro da indústria, buscou-se otimizar o processo de sanitização, bem como encontrar medidas alternativas que garantam a segurança dos alimentos industriais. Com o intuito de preservar as características do alimento e otimizar o processo, de forma a eliminar os contaminantes, buscou-se neste trabalho conhecer os pontos os quais devem ser controlados e estudar com isso um método eficaz para remoção dos micro-organismos. A aplicação do ultrassom vem ganhando espaço no estudo da microbiologia devido a sua capacidade de destruição das células, causada pela cavitação das bolhas de ar e preservação das características do alimento. Esse método pode apresentar algumas limitações se aplicado isolado, porém medidas alternativas, como métodos combinados, com utilização de calor ou outro método sanitizante, até os próprios sanitizantes industriais, apresentam bons resultados para eliminação microbiológica. O mapeamento dos pontos de possíveis contaminação industrial é uma forma de eliminar focos e

contaminação cruzada. Não foram encontrados relatos na literatura sobre métodos de eliminação microbiológica em agulhas de injeção, as quais apresentam problemas na higienização em escala industrial, justificando o presente estudo de forma a encontrar um método eficaz para a sua total sanitização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em uma indústria de abate e industrialização de produtos cárneos suínos, com inspeção Federal, situada na região Sul do Brasil. A indústria produz um amplo mix de industrializados derivados da carne suína incluindo cortes temperados, produtos resfriados, embutidos, frescais e defumados.

4.1. Rastreamento de locais de contaminação na indústria

Visando mapear os possíveis locais de contaminação microbiana dentro da indústria de alimentos, realizou-se um estudo avaliando a presença de micro-organismos em produtos processados por um frigorífico de grande porte, antes do congelamento.

Foram realizados análises para *Salmonela* sp. e *L. monocytogenes*, dos produtos após manipulação nos setores X, Y e Z.

Após avaliação dos dados encontrados para cada produto e setor, foi realizada análise de swab de superfície no setor que apresentou maior número de contaminação. Os pontos analisados foram ralo/calha, chute/esteira, parte interna de equipamento, mureta/piso, pallet/contentor e teto.

As análises foram realizadas semanalmente no período de janeiro a setembro de 2016, tanto nos produtos como nas diferentes superfícies, visando ser representativa em diferentes condições de produção (verão e inverno).

4.2. Avaliação da formação de biofilmes em agulhas de injeção de salmoura

Após a detecção do principal ponto de contaminação, avaliou-se a adesão de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) em agulhas de injeção de salmoura.

Para a avaliação da adesão bacteriana foram utilizadas agulha hipodérmicas (120 mm comprimento x 3,0 mm espessura externa x 1 mm espessura interna) comumente utilizadas na indústria para aplicação de salmoura em produtos salgados pelo processo de injeção (Figura 3). Para este estudo foram utilizadas agulhas usadas, buscando-se as condições mais favoráveis à formação de biofilmes pelo aumento irregular de desgaste destas, em ensaios.

A preparação das agulhas para os testes foi seguida de uma higienização com água, após esfrega com detergente neutro líquido, enxágue com água corrente seguida por água destilada e desinfecção por imersão em água destilada fervente (100^{o} C) por 5 min, sendo este procedimento adotado previamente a todos os ensaios subsequentes com as agulhas.

Figura 3: Agulha de injeção de salmoura utilizada na unidade industrial em estudo.

Fonte: A autora.

Após a higienização e desinfecção as agulhas foram imersas em caldo Luria Bertani - LB (10g/L triptona, 5g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl) previamente inoculado com 0,1 mL de pré inóculo de *L. monocytogenes* (~$1x10^8$ UFC/mL) e incubadas a 35-37°C por 3, 6, 12 e 24 h de contato com as agulhas, para permitir diferentes níveis de adesão da bactéria com as agulhas. Após a incubação, as agulhas foram retiradas do caldo LB, realizado enxágue com água deionizada corrente (15 s), seguida por três lavagens com água estéril agitadas em vortex (20 s).

A adesão bacteriana foi avaliada por contagem padrão em placas de diluente injetado na parte interna da agulha e swab da parte externa da mesma.

4.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de ácido peracético sobre *L. monocytogenes*

Na determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de ácido peracético sobre *L. monocytogenes* em condições laboratoriais, foram utilizadas microplacas de Elisa com caldo padrão para contagem (5 g/L digestão enzimática da caseína; 2,5 g/L extrato de levedura; 1 g/L glicose/dextrose) e inóculo de ~$5x10^6$ UFC/mL de *L. monocytogenes* incubado por 24 horas a 35 °C. Após a incubação, foi aspirado o meio, e realizadas duas lavagens com 200 µL de solução salina para remoção de células planctônicas. Em seguida, foi adicionado o ácido peracético (17% - ECOPER Química) em diferentes concentrações e após 10 minutos, o sanitizante foi removido e as cavidades foram novamente lavadas duas vezes com 200 µL de solução salina e Tween 80, para a completa remoção do sanitizante. Posteriormente pipetado 150 µL de caldo padrão para contagem estéril às cavidades e a placa foi incubada a 35 ºC novamente. Após 24 horas foi efetuada a leitura de densidade óptica no leitor de microplacas de Elisa (EL800 Biotek Instruments, INC.) em comprimento de onda de

490 nm, para analisar o crescimento das células através da turvação do meio que indica a Concentração Bactericida Mínima do sanitizante utilizado (FLACH, 2015).

Para a avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do ácido peracético sobre biofilmes de *L. monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura, as agulhas foram incubadas com o micro-organismo teste por 6 ou 24 horas de crescimento, visando simular os tempos entre as sanitizações industriais. Após a incubação foram realizados três enxágues com água deionizada, sendo em seguida imersas em tubos de ensaio contendo 30 mL de solução detergente alcalino clorado (Easyfoan/ Diversey) e ou combinação com detergente ácido (Kalyclean 244), por 10 min., conforme indicação do fabricante.

Para avaliar a CBM em condições laboratoriais, após a aplicação do detergente, as agulhas foram imersas em solução do sanitizante ácido peracético-AP (17% - ECOPER Química) em diferentes concentrações (0,03; 0,06; 0,12, 0,24 e 0,30%). Após o tempo de contato recomendado pelo fabricante do sanitizante (10 min), as agulhas foram submetidas ao swab da parte externa e estes inoculados em agar LB (LB e agar 15 g/L), e incubados a 35-37ºC por 24h, seguido por contagem das colônias.

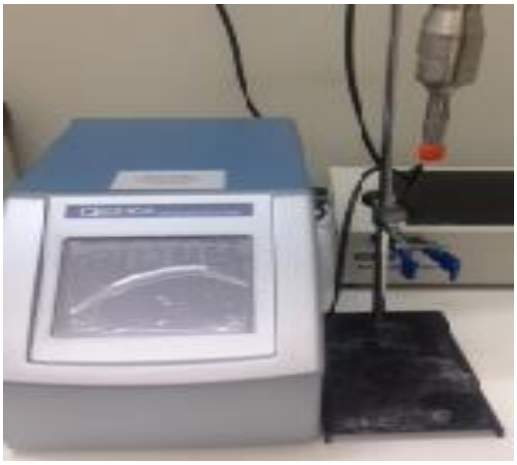
Para avaliar a CBM simulando a sanitização realizada na industria, após a aplicação do detergente as agulhas foram enxaguadas com água estéril e aspergidas com ajuda de seringa pela parte interna e externa com 10 mL da solução sanitizante a ser testada, ácido peracético-AP (17% - ECOPER Química) em diferentes concentrações. O sanitizante industrial foi pré diluído nas concentrações 0,03; 0,06; 0,12; 0,24 e 0,30% para aplicação nas agulhas incubadas por 24h e nas concentrações 0,015; 0,03; 0,06 e 0,12% para 6h de incubação. Após o período de atuação de 10 min. conforme descrição do fabricante, as agulhas foram aspergidas internamente com 10 mL de solução de água peptonada (peptona 10,0 g/L, fosfato de hidrogênio 9,0 g/L, NaCl 5,0 g/L, fosfato de potássio 1,5 g/L) e 3% de tween 80 (para inativação do ácido peracético residual). O líquido foi plaqueado por imersão em ágar LB (LB e ágar 15 g/L), as quais foram incubadas a 35-37ºC por 24h, seguido por contagem das colônias.

4.4. Avaliação do efeito do ultrassom na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas a agulhas de injeção

Para a avaliação do ultrassom na remoção das bactérias aderidas nas agulhas de injeção de salmoura, estas foram submetidas ao processo de adesão descrito no item 4.2 e posteriormente tratadas com sonda de ultrassom de 20 kHz (QSonica, CT., USA) em diferentes tempos (0, 3,5 e 14,0 min.) com intervalos de 30 em 30 s em banho de gelo e

diferentes potências (60, 75 e 90% / 700 watts) e em seguida realizado plaqueamento do líquido em meio ágar LB (Figura 4).

Figura 4: Aparelho de ultrassom com sonda utilizado na emoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas em agulhas de injeção de salmoura.



Fonte: A autora.

As diluições foram realizadas em água peptonada para plaqueamento em superfície em placas contendo ágar LB, as quais foram incubadas a 35-37ºC por 24h, seguido por contagem das colônias. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A redução da carga microbiana foi expressa em Log UFC, em relação ao tempo 0 (controle).

4.5. Avaliação do efeito de água quente na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas a agulhas de injeção

As agulhas previamente incubadas com *L. monocytogenes* descrito no item 4.2, foram enxaguadas com água estéril, após aspergidas com auxílio de seringa por água quente (82,2°C) por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 s, para avaliação da remoção microbiana, conforme preconizado na Circular 175/2005/MAPA (BRASIL, 2005). Após aspersão com água quente, o interior da agulha foi avaliado, injetando água peptonada/tween 80 descrito no item 4.3 para posterior plaqueamento em profundidade em meio ágar LB.

4.6. Efeito combinado de ultrassom e ácido peracético

O melhor resultado de remoção de *L. monocytogenes* obtido com aplicação do método ultrassônico e diferentes concentrações de ácido peracético foram testados para avaliar o

efeito combinado destes dois métodos, pela redução da concentração bactericida mínima do sanitizante.

4.7. Efeito da higienização prévia com detergentes alcalino e ácido e sanitização com ácido peracético

O tratamento prévio com o detergente alcalino (1,5% do produto comercial) e ácido (1,0% do produto comercial) foi feito pela injeção de 10 mL da solução com detergente alcalino (9 mL na parte interna da agulha e 1mL na parte externa) e exposição por 10 min. seguido de enxague com água destilada estéril e injeção da solução de detergente ácido com o mesmo procedimento, em agulhas com biofilmes de *L. monocytogenes* previamente aderidas com contato por 24 h descrito no item 4.2. Posteriormente, as agulhas foram lavadas com água destilada estéril e submetidas às diferentes concentrações de ácido peracético para determinação da concentração bactericida mínima conforme item 4.3.

4.8. Análises microbiológicas

4.8.1. Detecção de *L. monocytogenes*

Análise para presença/ausência em 25g de amostra, conforme descrito em ISSO 11290-1 (1996), realizada pelo laboratório de controle de qualidade da própria Empresa.

4.8.2. Detecção de *Salmonella* sp.

Método SLM Easy Vidas, (AOAC official method, 2011.03 - Salmonella in a Variety of Food-VIDAS® Salmonella (SLM) Easy Salmonella Method, 20th ed., 2016), realizada pelo laboratório de controle de qualidade da própria Empresa.

4.8.3. Contagem padrão em placas

A avaliação da adesão bacteriana e da remoção de *L. monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura foi realizada pela técnica da contagem padrão em placas. Os plaqueamentos em superfície e por imersão foram realizados em meio ágar LB e incubação por 24 h a 35-37°C, para posterior contagem das colônias e verificação da possível redução no número de unidades formadoras de colônias viáveis. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados expressos em Log UFC/cm^2.

4.9. Análise Estatística

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como gráficos foram obtidos com o programa Excel. Os resultados de efeito do ultrassom foram tabelados e submetidos a ANOVA seguida de teste de Tukey (95% de confiança) para comparação das médias usando o programa SPSS student version 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rastreamento de locais de contaminação na indústria

Com o intuito de rastear os possíveis pontos de contaminação microbiana dentro de uma indústria de alimentos, foram analisados produtos de vários setores de manipulação de uma empresa de grande porte que atua na área de cárneos, no período de janeiro a setembro de 2016. A Tabela 2 apresenta os produtos que indicaram contaminação por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. e a porcentagem de análises que apresentaram contaminação para cada produto durante este período, bem como o número (n) de análises por produto.

Tabela 1: Análise microbiológica de produto no período de janeiro a setembro de 2016, apresentando % de análise de cada produto com contaminação/análises realizadas.

Produtos	**Setor de Manipulação**	***Listeria monocytogenes* (%)**	***Salmonella* sp. (%)**
Produto 1 (n=45)	X	0	39
Produto 2 (n=45)	X	0	39
Produto 3 (n=45)	X	0	0
Produto 4 (n=45)	X	0	0
Produto 5 (n=27)	Y	0	11
Produto 6 (n=27)	Y	0	11
Produto 7 (n=27)	Y	0	11
Produto 8 (n=27)	Y	0	0
Produto 9 (n=27)	Y	0	0
Produto 10 (n=27)	Y	0	0
Produto 11 (n=27)	Y	0	0
Produto 12 (n=27)	Y	0	0
Produto 13 (n=27)	Y	0	0
Produto 14 (n=27)	Y	0	0
Produto 15 (n=27)	Y	0	0
Produto 16 (n=27)	Y	0	0
Produto 17 (n=27)	Y	0	0
Produto 18 (n=27)	Y	0	11
Produto 19 (n=27)	Y	0	11
Produto 20 (n=27)	Y	0	11

Produto 21 (n=27)	Y	0	11
Produto 22 (n=27)	Z	11	0
Produto 23 (n=18)	Z	67	0
Produto 24 (n=45)	Z	71	0
Produto 25 (n=27)	Z	33	0
Produto 26 (n=45)	Z	0	0
Produto 27 (n=45)	Z	0	0
Produto 28 (n=27)	Z	0	0
Produto 29 (n=27)	Z	0	0
Produto 30 (n=27)	Z	0	0
Produto 31 (n=27)	Z	0	0

Fonte: Autor, 2016

Após a análise dos produtos, para certificação e rastreamento, tabelou-se os dados conforme os setores que manipulam os produtos citados na Tabela 2. A Tabela 3 apresenta os resultados em porcentagem de análises de produtos que apresentaram desvio para *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. divididos por setor de manipulação em Setor X, Setor Y e Setor Z no período de janeiro a setembro de 2016 de indústria manipuladora de alimentos de grande porte.

Tabela 2: Análises de produtos divididos por setor de manipulação para *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* no período de janeiro a setembro de 2016.

Setores	**Presença de *Listeria monocytogenes* (%)**	**Presença de *Salmonella* sp. (%)**
Setor X (n=180)	11	15
Setor Y (n=450)	0	3
Setor Z (n=315)	47	8

Fonte: Autor, 2016

Ao analisar as Tabela 2 e 3 observou-se que os produtos manipulados no setor Z possui índice de contaminação por *Listeria monocytogenes*.

A contaminação por *Salmonella* sp. foi maior no setor X. Considerando a maior incidência de *L. monocytogenes* em relação a *Salmonella* no setor Z, optou-se por continuar as avaliações somente com esta bactéria e neste setor.

Segundo Poimenidou et al. (2016), estirpes de *L. monocytogenes* foram isoladas depois de um procedimento de limpeza e detectado a presença em 11,5% de amostras de superfícies que entram em contato com os alimentos. Os locais mais problemáticos foram as correias transportadoras e outros sistemas de transporte, pisos e drenos, equipamentos de cozinha e tábuas de corte.

Para rastear os possíveis pontos de contaminação de *L. monocytogenes* e *Salmonella* dos produtos nos setores estudados, foram realizadas análises de *swab* nas superfícies em que estes produtos entram em contato. Os pontos foram mapeados e separados em categorias como, ralo/calha, chute/esteira, parte interna de equipamento, mureta/piso, pallet/contentor e teto. Os resultados encontrados para as análises de *swab* após a higienização operacional mostram ausência dos micro-organismos nos pontos analisados. Verificando a eficiência do programa de limpeza e sanitização utilizados pela empresa. A empresa possui o programa APPCC implementado, monitora os Pontos de Controle, treina empregados, segue as Boas Práticas de Fabricação e os Programas Sanitários Operacional.

Visando confirmar a contaminação por *L. monocytogenes* analisou-se os produtos processos no setor Z, e somente produtos que passaram pelo processo de injeção em % apresentaram contaminação, com isso verificou-se antes e após injeção de salmoura e constataram-se para ambas as análises ausência de contaminação antes da injeção e presença após a injeção.

Como sequência do rastreamento, foram analisados a salmoura e o equipamento de injeção, bem como esteiras do equipamento, parte interna e externa, as quais apresentaram ausência para *L. monocytogenes*.

Com a verificação de todos os pontos de possíveis riscos de contaminação na indústria não foram encontrados focos de contaminação através das análises de *swab* em todos os equipamentos e utensílios do setor Z, bem como nos produtos anteriormente a aplicação de salmoura. Desta forma restaram apenas os produtos após a injeção, os quais passam pelo equipamento de injeção, como todos os pontos no equipamento testados por *swab* não apresentaram desvios, as agulhas as quais a análise de *swab* não é aplicável, devido ao diâmetro interno, foram estudadas para verificar formação de biofilme e métodos para eliminar de forma otimizada os biofilmes internamente as agulhas.

Segundo Henriques et al. (2016), a ocorrência de *L. monocytogenes* a qual está associada a doenças humana, em indústrias apresenta uma classificação sobre o sistema de sanitização, a qual a presença deve ser avaliada para identificação da fonte de contaminação. Isso reforça a importância de um diagnóstico da eficácia do sistema de sanitização através de

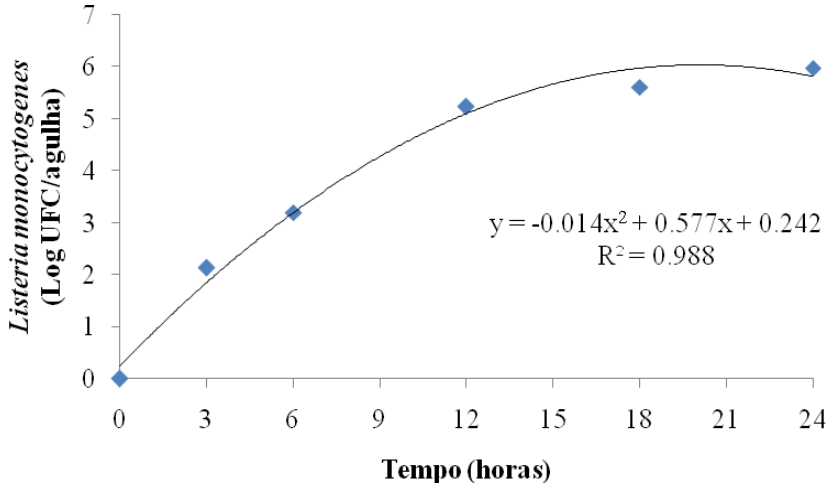
testes microbiológicos. Segundo o autor, os sistemas de gestão da segurança de alimentos das indústrias precisam ser melhorados, particularmente nas operações de limpeza, controle analítico, manutenção preventiva, higiene pessoal e análise de causa raiz saneantes.

Devido à falta de estudos sobre contaminação microbiana em agulhas de injeção de salmoura, as quais são de difícil sanitização pelo formato apresentado, este trabalho avaliou a formação de biofilme bem como diferentes métodos de limpeza e sanitização destes utensílios utilizados em indústrias de processamento cárneos.

5.2. Adesão de *L. monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura

A adesão de *L. monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura é apresentada na Figura 5. Observou-se um rápido crescimento bacteriano nas primeiras 12 h, com tendência a se estabilizar às 24 h.

Figura 5: Cinética de adesão de *Listeria monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura.



A literatura sobre a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em superfícies em geral é escassa e inexistente em agulhas de injeção de salmoura, tornando difícil a realização de uma discussão comparativa dos resultados obtidos. Ronner e Wong (1993) definiram a formação de biofilme como uma recuperação maior que 3,0 Log UFC/cm^2. Assim, de acordo com este critério, formação de biofilme de *L. monocytogenes* ocorreu após 6 h de contato das agulhas com a bactéria. Sabe-se que a formação de biofilmes pode ocorrer em um curto espaço de tempo, e que o mesmo pode reduzir a ação do sanitizante (BELTRAME et al., 2016).

A grande irregularidade da superfície interna das agulhas de injeção de salmoura facilitam a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* e provavelmente de outros micro-organismos associados. As bactérias têm uma tendência natural de aderir a superfícies como um mecanismo de sobrevivência e a colonização bacteriana de superfícies sólidas, o qual tem sido descrita como um estratagema bacteriano básico e natural numa ampla variedade de ambientes. Se material orgânico, células, minerais, depósitos de limpeza e outros detritos forem depositados sobre uma superfície, isso pode ser conhecido como incrustação orgânica. No processamento de alimentos, há incrustações constantes de superfícies pelos componentes de alimentos que estão sendo processados e esta incrustação forma a camada sobre a qual os micro-organismos aderem subseqüentemente, embutidos em biofilmes ou escondidos em fissuras ou fendas podem escapar procedimentos de limpeza e desinfecção e tornarem-se uma fonte de recontaminação de produtos alimentares durante o processamento (WHITEHEAD et al., 2004).

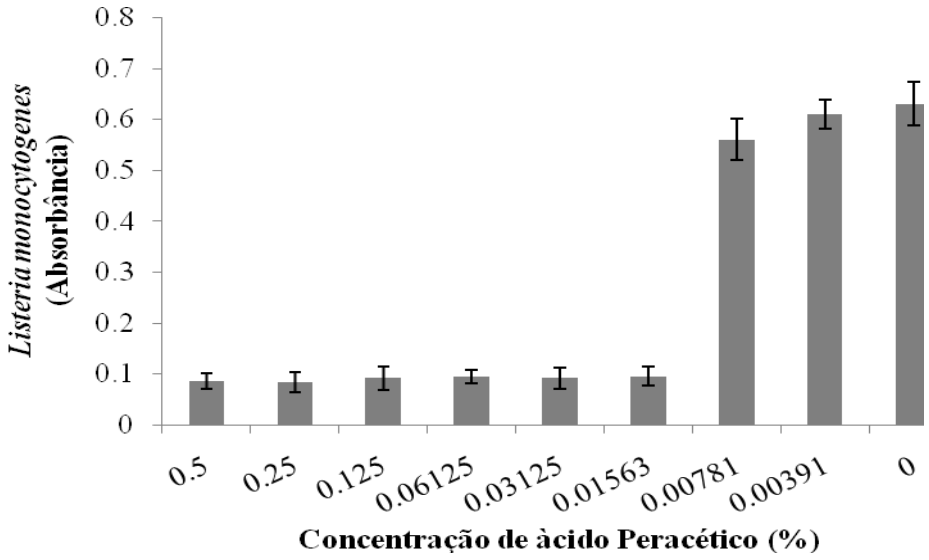
Diversos autores observaram que as irregularidades das superfícies poliméricas promovem a adesão bacteriana e a deposição de biofilme enquanto que superfícies lisas não favorecem a adesão bacteriana e a deposição de biofilme. Isto pode acontecer uma vez que uma superfície rugosa tem uma área de superfície maior e as depressões nas superfícies rugosas proporcionam locais mais favoráveis para a colonização (SCHEUERMAN et al., 1998; BARBOSA et al., 2016).

5.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de ácido peracético sobre *L. monocytogenes*

5.3.1. CBM em condições laboratoriais

Visando obter um parâmetro da eficácia do sanitizante ácido peracético sobre *L. monocytogenes*, foi determinada a CBM deste em condições laboratoriais (biofilmes previamente aderidos em microplacas de Elisa por 24 horas) (Figura 6).

Figura 6: Determinação da Concentração Bactericida Mínima de ácido peracético sobre *Listeria monocytogenes*.



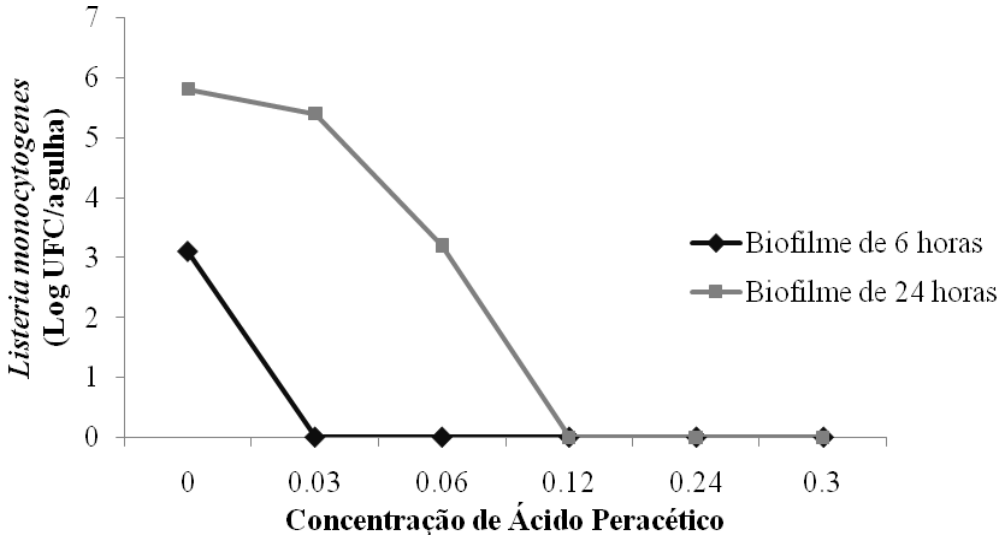
A menor concentração de ácido peracético com 10 minutos de exposição, capaz de matar as células aderidas em biofilme de *L. monocytogenes* foi de 0,015% sendo definida como a CBM em condições laboratoriais.

A atividade desinfetante do ácido peracético é baseada na liberação de oxigênio ativo. Ele rompe funções quimiosmóticas de lipoproteínas da membrana citoplasmática e o transporte por meio da deslocação ou da ruptura da parede celular. Isso pode ser igualmente efetivo contra lipoproteínas da membrana externa, facilitando a ação contra bactérias Gram-negativas. O ácido peracético intracelular pode também oxidar enzimas essenciais. Assim, vias bioquímicas vitais, transporte através da membrana e níveis de solutos intracelulares são danificados, além de alterações na molécula de DNA (KITIS, 2004).

5.3.2. CBM por imersão das agulhas em ácido peracético

Este teste foi realizado buscando-se avaliar a eficácia da imersão em ácido peracético sobre biofilmes formados na superfície das agulhas de injeção de salmoura. Os resultados da determinação da CBM em agulhas submersas em ácido peracético por 10 min encontram-se na Figura 7.

Figura 7: Determinação da Concentração Bactericida Mínima de ácido peracético sobre *Listeria monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura submetidas a imersão por 10 min.

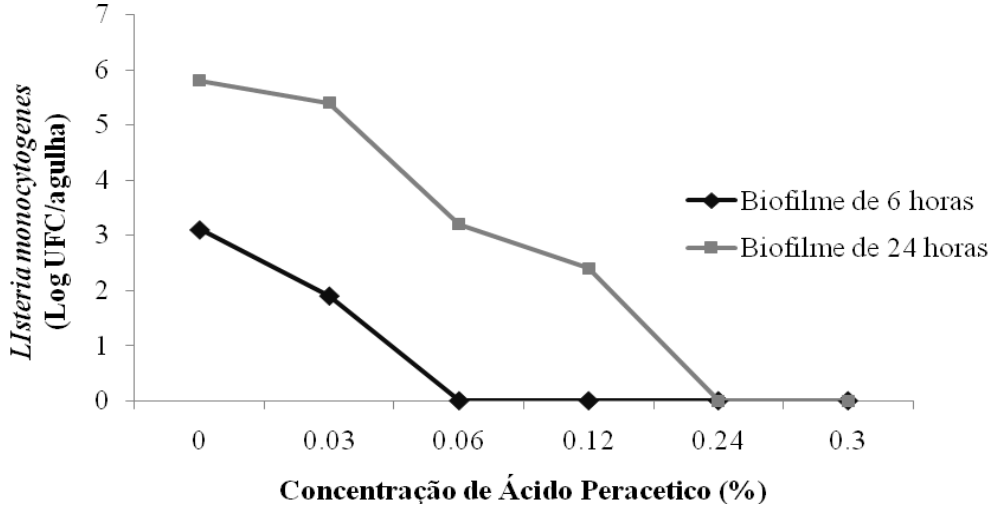


Observa-se diferença na CBM entre os tempos de contato da bactéria com as agulhas de injeção para formação do biofilme, obtendo-se CBM de 0,03 e 0,12% (v/v) para biofilmes de 6 e 24 horas de formação, respectivamente. De acordo com Frank et al. (2003), o ácido peracético pode reduzir mais de 6 log do biofilme de *L. monocytogenes* sobre aço inoxidável na presença de gordura e proteína de soro com uma concentração de 2,0 mL/L (0,02%) e um tempo de exposição de 10 min. Segundo Cabeça et al. (2008), o ácido peracético pode reduzir o biofilme de *L. monocytogenes* aderido durante 24 h em 5 Log com uma concentração de 0,50% m/v, resultados estes que podem ser comparados com o valor encontrado para o CBM obtido por imersão as agulhas na solução do sanitizante.

5.3.3. CBM por injeção de ácido peracético nas agulhas

Esta avaliação foi realizado visando simular as condições industriais de aplicação do sanitizante, o qual é aplicado sob pressão nas agulhas de injeção e mantido por 10 min até o enxágue (devido a dificuldade de desmontagem das agulhas). Observou-se que a CBM para 24h de incubação foi em 0,24% (v/v) de ácido peracético sobre *L. monocytogenes* e para 6h de incubação de 0,06% (v/v), considerando o processo simulado ao industrial, com injeção da solução de ácido utilizando seringa (Figura 8).

Figura 8: Determinação da Concentração Bactericida Mínima de ácido peracético sobre *Listeria monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura submetidas a injeção do sanitizante e ação por 10 minutos.



Assim como no processo de imersão, observou-se diferenças de CBM para os diferentes tempos de formação de biofilmes. Os dados encontrados neste trabalho podem ser comparados aos de Poimenidou et al. (2016), os quais verificaram para *L. monocytogenes* presente em plantas de processamento de alimentos, um CBM para tratamento com ácido peracético variando entre 115 a 2713 ppm (0,0115 a 0,2713%). Os mesmos autores justificam também a CBM maior para tempos maiores de incubação, como verificado no presente estudo o qual apresentou CBM maior para 24h de incubação com *L. monocytogenes* se comparado a 6h de incubação, concluindo que o tempo está diretamente relacionado com ao CBM, devido supostamente a formação do biofilme e com isso aumento da resistência a sanitizantes.

Belessi et al. (2011) estudaram a resistência do biofilme de *L. monocytogenes* em condições de processamento de alimentos e verificaram que as bactérias sobreviventes em aço inoxidável diminuem à medida que o tempo de exposição a ácido peracético 2% aumenta e não puderam ser detectados após 6 min de exposição.

Comparando-se os dois métodos observa-se que a imersão em sanitizante por 10 min apresenta um eficácia duas vezes maior se comparado com a injeção do sanitizante através da agulha. Porém, devido à dificuldade de montagem e desmontagem do equipamento o valor a ser considerado é aquele que simula o processo industrial, podendo o tempo de contato ser um dos fatores a ser otimizado durante a sanitização industrial, ou realizar mais de uma injeção do sanitizante no mesmo processo de sanitização visando aumentar a sua eficácia, embora ainda não testados.

5.4. Avaliação do efeito do ultrassom na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas a agulhas de injeção

A Tabela 4 apresenta os resultados referentes ao efeito do tempo de exposição e da potência do equipamento de ultrassom na remoção de *L. monocytogenes* aderidas em agulhas de injeção de salmoura.

Tabela 3: Efeito de diferentes tempos de exposição e potência do ultrassom na remoção de *L. monocytogenes* aderidas em agulhas de injeção de salmoura.

Tratamentos (20 KHz/700w)	**Tempo de Exposição ao Ultrassom (min)**	***L. monocytogenes* (UFC)**	**Redução (Log UFC)**	**Redução (%)**
60%	0 (controle)	$1,4x10^{6\ ab} \pm 6,1x10^{3}$	-	0
60%	3,5	$9,3x10^{4\ bc} \pm 8,3x10^{2}$	1,18	93,36
60%	14,0	$2,0x10^{4\ c} \pm 8,9x10^{2}$	1,84	98,57
75%	0 (controle)	$1,4x10^{7\ a} \pm 8,6x10^{3}$	-	0
75%	3,5	$2,0x10^{5\ b} \pm 3,1x10^{3}$	1,85	98,57
75%	14	$9,7x10^{3\ cd} \pm 2,4x10^{1}$	3,25	99,93
90%	0 (controle)	$1,3x10^{5\ b} \pm 4,4x10^{2}$	-	0
90%	3,5	$4,3x10^{3\ d} \pm 4,9x10^{1}$	1,48	96,69
90%	14,0	$1,8x10^{3\ d} \pm 1,9x10^{1}$	1,86	98,61

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.
Fonte: Autor, 2016.

Ao analisar a Tabela 4, observa-se que o aumento no tempo de exposição ao equipamento gerou uma redução na carga microbiana de 1,18 a 1,84 Log UFC com 60% de potência, 1,85 a 3,25 Log UFC com 75% e 1,48 a 1,73 Log UFC com 90% de potência do ultrassom. Esta redução pode ser explicada pelo mecanismo de morte microbiana gerado pelo desgaste da membrana celular, aquecimento localizado e produção de radicais livres (BRONDUM et al., 1998; BUTZ e TAUSCHER, 2002). Porém, Bhat e Goh (2017) citam que o processo de sonicação foi ineficaz para a redução da carga microbiana em amostras de suco de morango como tratamento de 0, 15 e 30 min a 20 ºC, de frequência de 25kHz.

No presente trabalho, embora a maior potência (90%) tenha apresentado menor carga microbiana inicial se comparada com a potência de 60%, a redução em Log UFC com 14 minutos de sonicação foi semelhante a obtida com 60% da potência. Já, com 3,5 minutos de sonicação, a maior potência resultou em maior redução de contaminação em relação a 60% da potência, indicando haver influência de interação tempo de exposição e potência na destruição microbiana em biofilme previamente formado. Pivasena et al. (2003) justifica que o tempo de exposição e amplitude das ondas ultrassônicas são o fator na eficácia da inativação microbiana.

Comparando os valores para redução de carga microbiana observa-se que a maior redução foi observada para a potência de 75%, em 3,25 Log de UFC, isso pode ser justificado segundo estudo do autor Erriu et al. (2014) o qual relatou que dependendo da potência e tempo de utilização do equipamento este pode ser eficaz para remoção ou pode ser um potencial para formação de biofilmes microbianos.

Como afirmado por Sala et al. (1995), a eficiência do ultrassom no processamento de alimentos depende do tipo de bactéria a ser tratada. Segundo Pagan et al. (1999), *L. monocytogenes* pode ser inativada por meio de ultrassom combinado com outros tratamentos, pois o tratamento com ultrassom a 20kHz à temperatura ambiente não apresentou eficácia, porém na presença de calor houve uma redução de 6 ciclos logarítmicos.

O processo de ultrassom, para apresentar eficácia na redução e esterilização microbiana em qualquer aplicação prática, agiria melhor se aplicado associado a um tratamento de pressão, térmico ou ambos (PIVASENA et al., 2003).

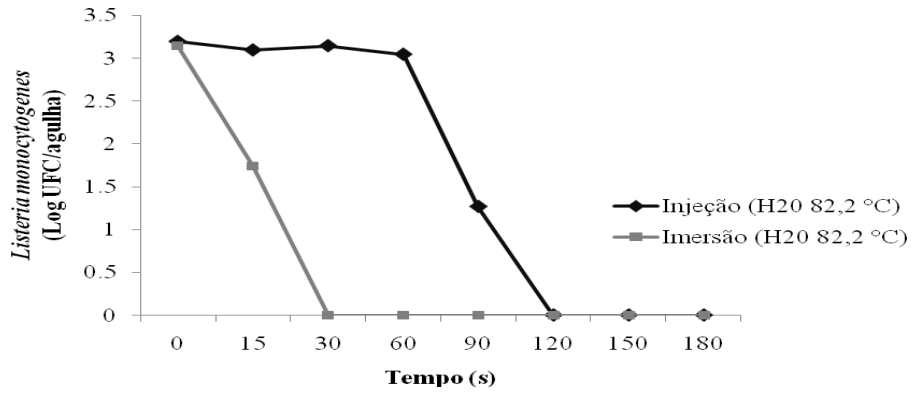
A alta potência a frequência mais baixas (20 a 100 kHz) no processo de ultrassom tem a capacidade de causar cavitação, que tem como finalidade no processamento de alimentos de inativar micro-organismos. Estas regiões de mudança de pressão provocadas pela cavitação formam bolhas de gás que devido a difusão e expansão geram condensação, moléculas condensadas colidem criando ondas de choque. A alteração na pressão resulta de implosões o qual é o principal efeito bactericida do ultrassom (PIVASENA et al., 2003).

5.5. Avaliação do efeito de água quente na remoção de *L. monocytogenes* previamente aderidas a agulhas de injeção

A Figura 9 apresenta os resultados referentes ao efeito da água quente na remoção de *L. monocytogenes* aderidas em agulhas de injeção. Observando a Figura 6, pode-se concluir que para a remoção total do biofilme formado por *Listeria monocytogenes* (UFC), considerando o processo de imersão em água quente um tempo de 30 segundos é suficiente,

porém considerando a remoção interna total, ou seja eliminar o biofilme no interior da agulha, a qual apresenta espessura de 1mm, é necessário um tempo de 120 s.

Figura 9. Efeito da água quente (82,2°C) na remoção de *L. monocytogenes* aderidas em agulhas de injeção.



Barbosa et al. (2016), verificou que a imersão em água quente (82,2°C) por 15 s, tipicamente utilizada em indústrias, provou ser eficiente para remoção do biofilme na maioria das superfícies avaliadas (facas utilizadas para desossa novas e usadas) com exceção aos cabos de facas usadas.

Pode-se verificar também que o tempo para eliminação total de 30 s por imersão, está acima do tempo preconizado pela Circular 175/2005 (BRASIL, 2005) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o qual determina que a higienização dos instrumentos de trabalho precedidos da lavagem dos mesmos, far-se-á em esterilizadores com temperatura mínima de 82,2 ºC (180 ºF), por um tempo mínimo de 15 s. O processo de injeção de água quente necessitou um tempo 8 vezes maior que o preconizado por esta legislação.

A necessidade de exposição das agulhas por um tempo maior, pode ser devido estas apresentam pontos de difícil acesso (internamente), com rugosidades, os quais podem dificultar a eliminação do biofilme, principalmente por processos de envolvem água quente.

Alguns autores citam também a pasteurização com água quente, a qual concluem como sendo eficaz para redução de micro-organismos. Haugea et al. (2011), verificaram que a pasteurização de carcaças de cordeiro (82°C por 8 segundos) reduziu significativamente os níveis de *Escherichia. coli*, Enterobacteriaceae, *Bacilus. cereus* e contagem de bactérias aeróbicas. Para *E. Coli* (UFC) a redução foi de 99,5%, correspondendo a uma redução de 1,85 log UFC por carcaça de cordeiro. O tempo utilizado pelo autor (8 s), está condizente com outros autores, porém apresenta um resultado diferente se comparado com os tempos encontrados para o tratamento interno de agulhas de injeção de salmoura.

Com isso verifica-se a necessidade de um tratamento para o interior das agulhas de injeção, as quais apresentam barreiras no que se refere a higienização e sanitização.

5.6. Efeito combinado de ultrassom e ácido peracético

A determinação da CBM foi usada para avaliar a combinação de ultrassom e ácido peracético. Como já encontrado para o emprego do ultrassom separadamente, observa-se que a uma potência de 75% por 14 min, obteve-se uma redução de 3,25 log de *L. monocytogenes* em agulhas de injeção de salmoura, porém sem redução total, não sendo possível determinar uma potência/tempo bactericida mínimo do ultrassom.

O método combinado reduziu a concentração bactericida mínima do ácido peracético de 0,24% para 0,03% (Figura 10), verificando que a combinação dos métodos tornou-se eficaz a uma concentração significativamente baixa de ácido peracético.

Oulahal et al. (2007) utilizaram um transdutor ultra-sônico curvo para teste de sanitização de superfícies internas ou curvas que possuam contato com alimento para remoção de biofilme. Eles estudaram os biofilmes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* formados em chapas de aço inoxidável. Como resultado observaram que o método ultrassom (10s a 40 kHz) isolado não removeu completamente o biofilme: removeu 49 ± 5% e 39 ± 5% para *E . coli e S . aureus,* respectivamente. Porém um tratamento combinado, o qual envolveu a aplicação de ultrassom e soluções de enzimas, permitiram uma redução de até 75% ± 4% e de 100% ± 15% do biofilme de *E . coli e S . aureus,* respectivamente.

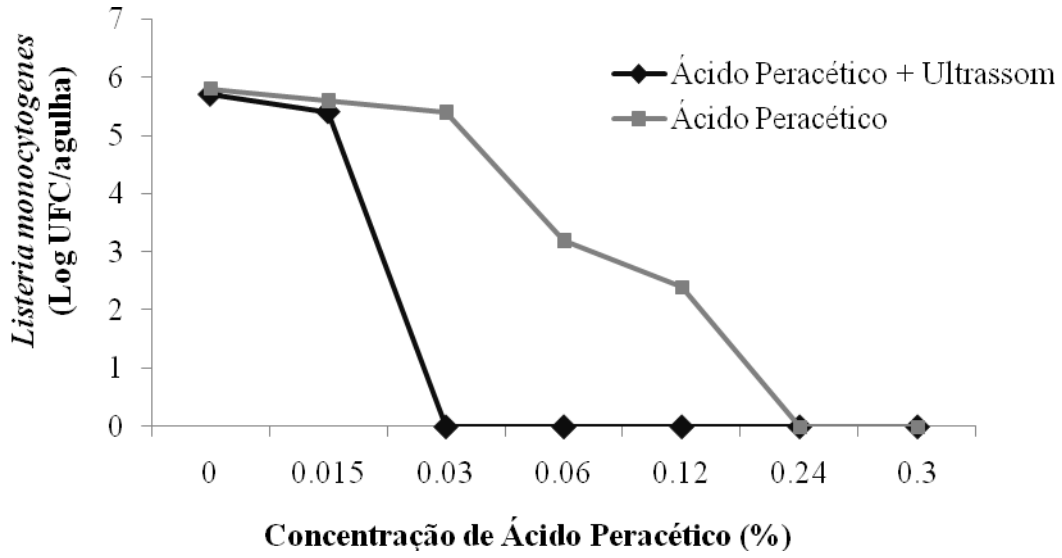
O processo de ultrassom vem sendo estudado como tecnologia "verde", não-química na indústria de carne para melhorar a qualidade e segurança da carne. Segundo os autores Turantas et al. (2015) o método de ultrassom combinado com outras aplicações, ou mesmo ultrassom a alta potência vem sendo estudado e adaptado para a indústria da carne como processo de descontaminação e inativação microbiana. Esses estudos apresentam como resultados que o ultrassom por si só ou em combinação com outros métodos de processamento e/ou preservação tem um potencial, prevenir o crescimento microbiano e recontaminação da carne, bem como para equipamentos de processo de limpeza.

Brasil et al. (2017) avaliaram um processo combinado para sanitização de facas utilizadas em indústria de carnes. A combinação de ultrassom com água clorada e detergente neutro foi utilizada para limpeza e saneamento simultâneos de facas utilizadas no abate de bovinos. O método de saneamento convencional promoveu diminuição nas contagens de mesófilos, Enterobacteriaceae, fungos e leveduras e foi observado comportamento semelhante para ultrassom combinado à água clorada (2,05 mg/L de cloro e operação normal

e de varredura por 10 min.) e ultrassom combinado com água clorada e detergente neutro (5 mL/L e modo de operação de varredura por 5 min). No entanto, quando a concentração de detergente e o tempo de sonicação foram aumentados (20 mL/L, 15 min.) houve uma forte diminuição nas contagens de mesófilos, Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, fungos e leveduras.

Comparando os dados encontrados pelos autores citados, com os dados do presente estudo, pode-se verificar que o processo de ultrassom combinado com outros métodos sanitizantes é eficaz para tratamento de utensílios e superfícies utilizadas na indústria de alimentos.

Figura 10: Efeito do método ultrassom (14 min a 75%- 20kHz) combinado com ácido peracético em diferentes concentrações, para remoção de biofilme formado por *L. monocytogenes* (24 horas de contato) em agulhas de injeção de salmoura.



O estudo avaliando o método combinado entre água ácida eletrolizada (AEW), ultravioleta (UV) e ultrassom (US) contra *L. monocytogenes* em filetes de salmão, obteve como resultado para os tratamento UV + US e UV + US + AEW, uma redução significativamente maior em *L. monocytogenes*, de 0,79 e 0,75 log UFC/g, se comparada com o controle (0,17 log UFC/g) em água destilada (dH_2O), indicando que UV + US e UV + US + AEW foram eficazes na redução das populações de *L. monocytogenes* em filetes de salmão crus (MIKS-KRAJNIK et al., 2017).

Avaliando o efeito antimicrobiano de água eletrolisada ligeiramente ácida (AEW) através da adição de tratamento sinérgico com ultrassom (US) e tratamento térmico brando na

segurança microbiana de pimentão recém-cortado, ocorreu uma redução de aproximadamente 3,0 log UFC/g para *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*, com o tratamento AEW + US + 60°C. Os resultados demonstram que a combinação entre o ultrassom e calor brando tiveram efeito sinérgico contra os dois patógenos (LUO e OH, 2016).

Comparando a eficácia de tratamentos individuais (ultrassom 40 kHz e ácidos orgânicos 0,3, 0,5, 0,7, 1,0 e 2,0% ácido málico, láctico e cítrico por 5min.) e sua combinação na redução de *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium* e *L. monocytogenes* em alface fresca orgânica, o tratamento combinado de ultrassom e ácidos orgânicos resultou em 0,8 a 1,0 log de redução adicional em relação aos tratamentos individuais, sem causar significativa mudança de qualidade (cor e textura) em alface. As reduções máximas de *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* foram 2,75, 3,18 e 2,87 log CFU/g observadas após tratamento combinado com ultrassom e ácido orgânico a 2% durante 5 min, respectivamente. Sugerindo que o tratamento combinado do ultrassom com ácidos orgânicos foi eficaz na redução de patógenos em comparação com tratamentos individuais (SAGONG et al., 2011).

Segundo Gao et al. (2014), a razão da inativação do micro-organismo em função do tempo de sonicação para *Enterobacter aerogenes* como para *Aureobasidium pullulans* em Log diminui linearmente com o tempo de sonicação e a taxa de inativação aumenta (menor valor D) com o aumento no poder de sonicação. No presente estudo observou-se redução na concentração de sanitizante necessária para inativação de *L. monocytogenes* com o uso combinado com ultrassom indicando uma provável redução no tempo de exposição ao sanitizante (redução do valor D) em maiores concentrações (não avaliado no presente estudo).

Propõe-se com isso a combinação entre ultrassom e ácido peracético, por aumentar a taxa de inativação do micro-organismo (redução do valor D), pelo processo de cavitação gerado pelo ultrassom, removendo parcialmente o biofilme ou facilitando a ação do sanitizante. O método de ultrassom por ser um processo aplicado previamente a vários sanitizantes com maior facilidade de diminuir o número inicial de células, o que pode ser uma alternativa considerando métodos combinados.

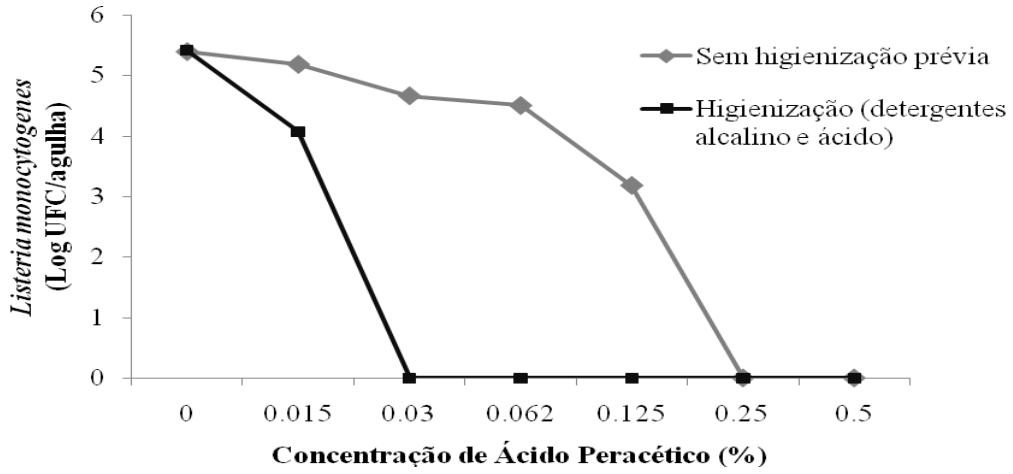
5.7. Efeito da higienização prévia com detergentes alcalino e ácido e sanitização com ácido peracético

A eficácia da higienização prévia com detergente alcalino e ácido seguida de sanitização com ácido peracético também foi avaliada para a remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* previamente aderidos nas agulhas de injeção de salmoura por 24 h.

A eficácia do sanitizante ácido peracético em diferentes concentrações na inativação de células aderidas de *L. monocytogenes* nas agulhas por 24 h, com e sem tratamento prévio de higienização com os detergentes é apresentada na Figura 11.

A CBM obtida sem a higienização prévia foi de 0,25%, semelhante à encontrada nos ensaios anteriores (0,24%). Observa-se uma redução na CBM do ácido peracético para 0,03%, confirmando a contribuição do uso dos detergentes alcalino e ácido na higienização prévia à sanitização.

Figura 11: Determinação da CBM de ácido peracético sobre biofilme de *L. monocytogenes* (24 horas de contato), com e sem higienização prévia com detergentes alcalino e ácido.



Esta alta eficácia foi provavelmente atribuída a higienização conjunta com detergente alcalino seguido de detergente ácido, os quais também tem ação bactericida. Além disso, a injeção de cada um dos detergentes e posteriormente do sanitizante possivelmente aumentaram o tempo de solvatação, facilitando a remoção do biofilme e consequente morte microbiana. Bremer et al. (2006), estudaram a eficácia da lavagem básica e ácida seguida de sanitizante na redução do número de bactérias viáveis ligadas às superfícies de aço inoxidável e observaram que a adição de um aditivo básico, melhorou a remoção do biofilmes formados em superfícies de aço inoxidável.

Na aplicação de detergentes para a higienização, deve-se considerar a hidrofobicidade do componente a ser eliminado. Muitos dos componentes das membranas biológicas são hidrofóbicos ou têm extensas superfícies hidrofóbicas. Os componentes lipídicos da parede bacteriana não são solúveis em água. Os detergentes são moléculas anfipáticas que, devido à sua estrutura química, formam micelas (estruturas globulares) com interiores hidrofóbicos e

superfícies polares. Os componentes de membrana hidrofóbicos podem ser transferidos das membranas para as micelas de detergente (YEAGLE, 2016).

Esta higienização alcalina e ácida é feita apenas uma vez por semana na maioria das industrias que utilizam agulhas de injeção de salmoura, mas os resultados indicam que o uso diário poderia aumentar a segurança alimentar em relação a eliminação de focos de biofilme de *L. monocytogenes* ou servir como tratamento específico quando da ocorrência desta bactéria na industria.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente obteve-se as seguintes conclusões:

O rastreamento microbiológico na indústria indicou maior foco de contaminação no setor Z. Observou-se maior contaminação de *L. monocytogenes* em relação à *Salmonella* sp. durante o período de rastreamento avaliado. O rastreamento dos produtos e da linha de produção do setor Z indicaram as agulhas de injeção de salmoura com maior potencial de contaminação;

A avaliação da adesão de *L. monocytogenes* nas agulhas indicou formação de biofilme após 6 horas de contato das agulhas com a bactéria;

A concentração bactericida mínima (CBM) do ácido peracético sobre biofilme de *L. monocytogenes* em condições laboratoriais foi de 0,015%;

Nas agulhas submetidas à imersão em ácido peracético por 10 min, determinou-se CBM de 0,03 e 0,012% para biofilmes de 6 e 24 h de contato com a bactéria, respectivamente;

A injeção de ácido peracético no interior das agulhas e com drenagem do mesmo a ação por 10 min forneceu CBM de 0,06 e 0,24% para biofilmes de 6 e 24 h de contato com a bactéria, respectivamente;

O método de imersão em sanitizante ácido peracético por 10 min apresentou o menor CBM se comparado com o método de injeção para o tratamento interno de agulhas de injeção de salmoura sobre o biofilme formado por *L. monocytogenes*;

A exposição das agulhas ao ultrassom propiciou uma redução da carga microbiana do biofilme de até 3,25 Log UFC/agulha com frequência de 20 KHz, 75% da potência (700w) e tempo de exposição de 14 min;

A água quente (82,2 °C) foi eficaz na remoção do biofilme de *L. monocytogenes* com imersão por 30 segundos ou injeção por 120 s;

A combinação entre o ultrassom por 14 min de exposição e 75% de potência (700w) com ácido peracético, apresentou um redução da CBM de 0,24% para 0,03%;

A higienização prévia com detergentes alcalino e ácido seguida de sanitização por injeção de ácido peracético apresentou redução da CBM de 0,25% para 0,03%.

Os resultados indicam que o uso combinado de ultrassom e sanitização ou uso diário de detergentes alcalino e ácido poderia aumentar a segurança alimentar em relação a eliminação de

focos de biofilme de *L. monocytogenes* ou servir como tratamento específico quando da ocorrência desta bactéria na indústria.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar biofilmes de outras bactérias de interesse industrial como por exemplo *Salmonella* sp.;

- Avaliar a eficácia de mais de uma injeção do sanitizante no mesmo processo de sanitização;

- Avaliar a cinética de inativação em mais de uma concentração de sanitizante e mais tempos de exposição ao ultrassom numa determinada potência, para determinação de valor D;

- Avaliar a ação de cada detergente separadamente na higienização prévia e posterior sanitização;

- Avaliar outros sanitizantes na remoção de biofilmes em agulhas de injeção de salmoura;

- Avaliar a eficácia dos tratamentos indicados em condições industriais.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.C.; MORÃO, R.P.; MARTINS, E.R.; FONSECA, F.S.A.; SOUZA, C.N.; PRATES, J.P.B.; OLIVEIRA, F.D.; SILVA, L.V. Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 36, n. 9, p. 905-911, 2016.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; LIMA, J.C. **Adesão e formação de biofilmes microbianos**. In: ANDRADE, N.J. (Ed). Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela. 412 p. 2008.

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, p. 69-92. 2005.

BAN, G.H.; KANG, D.H. Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. **Food Microbiology** v. 55, p. 47-54, 2015.

BAPTISTA, P. **Higienização de Equipamentos e Instalações na Industria agro-alimentar**. Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, 2003.

BARBOSA, J.C.S.; SERRA,A.A. Ultra-som (I): Influência do ultra-som na química., **Química Nova**, v. 1, p. 302-316, 1992.

BARBOSA, J.; CUPPINI, M.; FLACH, J.; STEFFENS, C.; CANSIAN, R. L.; TONIAZZO, G. Removal of Escherichia coli in boning knives with diferente sanitizers. LWT- **Food Science and Technology**. v. 71, p. 309-315, 2016.

BELESSI, C-E.A.; GOUNADAKI, A.S.; PSOMAS, A.N.; SKANDAMIS, P.N. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.1, p. s46-s52, 2011.

BELTRAME, C.A.; MARTELO, E.B.; MESQUITA, R.; ROTTAVA, IEDA; BARBOSA, J.; STEFFENS, C.; TONIAZZO, G; VALDUGA, E.; CANSIAN, R.L. Effectiveness of sanitizing agents in inactivating *Escherichia coli* (ATCC 25922) in food cutting board surfaces. **Italian Journal of Food Sciences**, v.28, p.148 - 154, 2016.

BERTHIER, F. M. **Ferramentas de Gestão da Segurança de Alimentos: APPCC e ISSO 22000 (uma revisão)**. Monografia apresentada ao Centro de Excelência de Turismo-CET da Universidade de Brasília- UnB, como requisito parcial à obtenção de grau de Especialista em Tecnologia de Alimentos- Brasília. 2007.

BETTS, G.D.; WILLIAMS, A.; OAKLEY, R.M. Ultrasonic Standing Waves: Inactivation of Foodborne Microorganisms Using Power Ultrasound. **Encyclopedia of Food Microbiology**, e.2, p. 659-664, 2014.

BOLES, B.R.; THOENDEL, M.; SINGH, P.K. Rhamonolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilm. **Molecular microbiology,** v. 57, n. 5, p. 1210-1223, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Circular Nº 175/2005/CGPE/DIPOA, de 16 de maio de 2005. **Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole**. Brasília, .38, 2005.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Importância do Codex Alimentarius. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em setembro de 2006.

BRASIL, C.C.B.; BARIN, J.S; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, C.R.; ZEPKA, L.Q.; WAGNER, R., CAMPAGNOL, P.C.B.; CICHOSKI, A.J. Singles step non-thermal cleaning/sanitation of knives used in meat industry with ultrasound. **Food Research International**, v. 91, p. 133-139, 2017.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A.J. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 254-262, 2006.

BHAT, R., GOH, K.M. Sonication treatment convalesce the overall quality of hand-pressed strawberry juice. **Food Chemistry**, v. 215, p. 470-476, 2017.

BRONDUM, J., EGEBO, M., AGERSKOV, C., BUSK, H. Online pork carcass grading with the autoform ultrasound system. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1859-1868, 1998.

BUTZ, P., TAUSCHER, B. Emerging technologies: chemical aspects. **Food Research International**, v. 35, p. 279-284, 2002.

CABEÇA, T.K.; PIZZOLITTO, A.C.; PIZZOLITTO, E.L. Assessment of action of desinfectants against Listeria monocytogenes biofilms**. Journal of Food and Nutrition**, e. 17, v. 2, p. 121-125, 2008.

CAMERON, M.; MCMASTER, L.D.; BRITZ, T.J. Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound. **Ultrasonics Sono chemistry**, v. 15, p. 960-964, 2008.

CARPENTIER; B.; CERF, O.; Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industr y. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p.499-511, 1993.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., Coliformes Totais e Fecais e *E. Coli* no leite cru e pasteurizado de uma Indústria de Laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Universidade Federal da Paraíba**: Campina Grande, 2001. Disponível em: http://www.scielo.brpdfctav21n38544.pdf. Acessado em: 23/04/2013.

CHAVANT, P.;GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, e. 3, p. 605-612, 2007.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna- N rubber. LWT- **Food Science and Technology**, v. 39, p. 11-19, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS- CAC/RCP-1-1969-Ver 3 (1997), Amd. (1999).

CNI/SENAI/SEBRAE/ANVISA. Elementos de apoio: boas práticas e sistema APPCC. Rio de Janeiro: SENAC/DN, 2001. 303p.

DOMINGOS, R.N. Contribuições e usos do ultrassom de média intensidade no preparo de catalisadores e produção ativada de etanol. Tese – **Instituto de Geociências e Ciências Exatas**, UNESP, Rio Claro, SP, 1998.

DRAGO, L.; TOSCANO, M. Biofilm formation and the biological response.Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIs), p. 25-39, 2017.

ERRIU, M.; BLUS, C.; SZMUKLER-MONCLER, S.; BUOGO, S.; LEVI, R.; BARBATO, G.; MANONNARIPA, D.; DENOTTI, G.; PIRAS, V.; ORRÙ, G. **Microbial biofilm modulation by ultrasound:** Current concepts and controversies, v. 21, p. 15-22, 2014.

FAVERO M.S.; GABIS D.A.; VESLEY D. Environmental monitoring procedures. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination os Foods. Washington: **APHA**, e. 2, p. 47-61, 1984.

FERRARI, C.I. Mapeamento de *Listeria* sp. Na Unidade FACH II da Aurora Alimentos. Monografia programa de Pós-Graduação na área de Tecnologia de Carnes, do Centro de Tecnologia de Carnes do **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 2013.

FERREIRA, V.M.O. DOS S. Marinação com soluções alcalinas e a qualidade da carne PSE em suínos. Dissertação em Zootecnia. Universidade Federal da Grande Dourados, **Faculdade de Ciências Agrárias**, 2011.

FERREIRA, C.; PEREIRA, A.M.; MELO, L.F. Biofilm control with new microparticles with new immobilized biocide. **Microbiologia Aplicada**, p.845-854, 2010.

FLACH, J. Caracterização e Controle de Biofilmes Formados por Bactérias Psicrotróficas Isoladas de Tanques para Refrigeração de Leite. 2015. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – UFRGS, Porto Alegre, 2015.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews,** v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FRANK, J.F.; EHLERS, J.; WICKER, L. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing under static condions. **Food Protection Trends**, e. 23, p. 654-663, 2003.

FRANZIN, M. Biguanida Polimérica Versatilidade e Diversificação em um só Produto; Boletim Técnico. AveciaBiocides. 2001. disponível em < http://www.opportuna.com.br/produtos/arquivos/Biguanida_Arch.pdf >; acesso em 09/06/2012.

GAO, S.; LEWIS, D.G.; ASHOKKUMAR, M.; HEMAR, Y. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. The simple model for the inactivation mechanism. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, pg. 454-460, 2014.

GOMES, M.Z. DO V. Utilização de biosurfatantes no controle da adesão bacteriana e na remoção de biofilmes de patógenos alimentares em superfície de poliestireno. Dissertação para Mestrado em Ciências do instituto de Química de São Carlos, 2011.

HENRIQUES, A.R; GAMA, L.T; FRAQUEZA, M.J. Tracking *Listeria monocytogenes* contamination and virulence-associated characteristics in the ready-to-eat meat-based food products industry according to the hygiene level. **International Journal of Food Microbiology**, v. 245, p. 101-106, 2016.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 424-434, 2010.

HAUGEA, S.J.; WAHLGRENC, M.; ROTTERUDA, O-J.; NESBAKKENB, T. Hot water surface pasteurisation of lamb carcasses: Microbial effects and cost-benefit considerations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 69-75, 2011.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International,** v. 30, n. 1, p. 47-55, 2004.

LIMA, A.W.O.; SOUSA, C.P. Infecções e intoxicações alimentares. In: Aspectos da ciência e tecnologia de alimentos. João Pessoa, PB: **Nova Idéia**, e. 1, v. 1, p.175-199, 2002.

LIN, S.; ZHANG, F. - Measurement of ultrasonic power and electroacoustic efficiency of high power transducers, Applied Acoustic Institute, Ultrasonics Sonochemistry – **Elsevier Science** B.V.; v. 37, p. 549-554, 2000.

LUO, K.; KIM, S.Y.; WANG, J.; OH, D-H. A combined hurdle approach of slightly acidic electrolyzed water simultaneous with ultrasound to inactivate Bacillus cereus on potato. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 615-621, 2016.

LUO, K.; OH, D-H. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica serovar Typhimurium* on fresh-cut bell pepper treated with slightly acidic electrolyzed water combined with ultrasound and mild heat. **Food Microbiology**, v. 53, p. 165-171, 2016.

MALHEIROS, J.; SIMÕES, M. Antimicrobial resistance of biofilms in medical devices. Biofilms and Implantable Medical Devices, p. 97-113, 2017.

MAPA/DAS/DIPOA/DCI – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL.GOV)/ Secretaria de Defesa Agropecuária/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Controle do Comércio Internacional. Especificação da Decisão da **Comissão n° 2001/471/CE. 27 de Maio de 2002**. Brasília.2002.

MIKS-KRAJNIK, M.; FENG, L.X. J.; BANG, W.S.; YUK, H-G. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and natural microbiota on raw salmon fillets using acidic electrolyzed water, ultraviolet light or/and ultrasounds**. Food Control**, v. 74, pg. 54-60, 2017.

MORETRO, T.; HEIR, E.; NESSE, L.L.; VESTBY, L.K.; LAGSRUD, S. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection, v. 45, p. 532-544, 2012.

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

OLSZEWSKA, M.A.; ZHAO. T.; DOYLE, M.P. Inactivation and induction of sublethal injury of Listeria monocytogenes in biofilm treated with various sanitizers. **Food Control**, v. 70, p. 371-379, 2016.

O'TOOLE, G.A; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. **Molecular Microbiology**, e. 30, v. 2, p. 295-304, 1998.

OULAHAL, N.; MARTIAL-GROS, A.; BONNEAU, M.; BLUM, L.J. Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, p. 192-196, 2007.

PAGAN, R., MANAS, P., ALVAREZ, I., CONDON, S. Resistance of Listeria monocytogenes to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures**. Food Microbiology**, v. 16, p. 139-148, 1999.

PERRY, J.A., CVITKOVITCH, D.G., LÉVESQUE, C.M. Cell death in *Streptococcus* mutans biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 299, n. 2, p. 261-266, 2009.

PETERSEN, F.C., TAO, L., SCHEIE, A.A. DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 13, p. 4392-4400, 2005.

PIVASENA, P., MOHAREB, E., MCKELLAR, R.C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 207-216, 2003.

PRENDERGAST, D.M.; DA LY, D.J. SHERIDAN, J.J; McDOWELL, D.A;BLAIR, I.S. The effect of abattoir design on aerial contamination levels and the relashionship between aerial and carcass contamination levels in two Irish beef abattoirs. **Food Microbiology**, Copenhagem, v. 21, p. 589-596, 2004.

PHULL, S.S.; NEWMAN, A.P.; LORIMER, J.P.; POLLET, B.; MASON T. J. The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water. **Ultrasonics Sono chemistry**, v. 4. P. 157-164. 1997.

POIMENIDOU, S.V.; CHRYSADAKOU, M.; TZAKONIATI, A.; BIKOULI, V.C.; NYCHAS, G-J.; SKANDAMIS, P.N. Variability of Listeria monocytogenes strains in biofilm formation on stainless and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 164-171, 2016.

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, n. 9, p. 750-758, 1993.

RUST, R.E.; KNIPE, C.L. Processing Equipment/Brine Injectors. **Encyclopedia of Meat Sciences**, e. 2, p. 123-125, 2014.

SALA, F.J., BURGOS, J., CONDON, S., LOPEZ, P., RASO, J. Effect of heat and ultrasound on microorganisms enzymes. **Blackie Academic and Professional**, GW Gould edition, p. 176-204, 1995.

SAGONG, H-G.; LEE, S-Y.; CHANG, P-S.; HEU, S.; RYU, S.; CHOI, Y-J.; KANG, D-H. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, pg 287-292, 2011.

SCHERBA, G.; Weigel, R.M.; O'Brien, J.R. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. **Applied and Environmental microbiology**, v. 57, n. 7, p. 2079-2084, 1991.

SCHEUERMAN, T.R.; CAMPER, A.K.; HAMILTON, M.A. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 208, p. 23-33, 1998.

SOUSA, C.P de. Segurança Alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo Coliformes como um dos indicadores de Qualidade de Alimentos. **Revista APS**, v.9, n.1, p. 83-88, jan./jun, 2006.

SOUZA, E.L.; SILVA, C.A.; SOUSA, C.P. Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 4, p. 559-566, 2005.

SOUZA, J.B.; DANIEL, L.A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *Escherichia. coli*, colifagos e *Campilobarcter. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, abr./jun, 2005.

SREY, S.; JAHID, I.K.; DO HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585, 2013.

THRUN, D. Sistemática do gerenciamento do processo suportado em medidas de controle para os serviços internos para a indústria de alimentos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 119 p, Florianópolis, 2003.

TURANTAS, F.; KILIÇ, G.B.; KILI, B. Ultrasound in the meat industry: General applications and decontamination efficiency. **International Journal of Food Microbiology**, v.198, e. 2, pg. 59-69, 2015.

UKUKU, D.O. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella***. Food Microbiology**, e. 23, p. 289-293, 2006.

VILAIN, S., PRETORIUS, J.M., THERON, J., BROZEL, V. S. DNA as an Adhesin: Bacillus cereus requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p. 2861–2868, 2009.

WANG, W.; ZHOU, X.; SUO, Y.; DENG, X.; CHENG, M.; SHI, C.; SHI, X. Prevalence, serotype diversity, biofilm-forming ability and eradication of *Listeria monocytogenes* isolated from diverse foods in Shanghai, China. **Food Control**, v. 73, p. 1068-1073, 2017.

WINKELSTROTER, L. Análise da expressão genica, formação de biofilme e adesão/invasão a célula Caco-2 por *Listeria monocytogenes* em diferentes condições encontradas no trato gastrintestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas. **Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, 2012.

WHYTE, P.; MCGILL, K.; COLLINS J.D. An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses. **Food Microbiology**, e. 20, p. 111–117, 2003.

WHITEHEAD K.A.; COLLIGON, J.; VERRAN, J. The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies using ion beam sputtering technology. **Inter Biodet Biodeg**, v. 54, p. 143–151, 2004.

YANG, H.; FEIRTAG, J.; DIEZ-GONZALEZ, F. Sanitizing effectiveness of commercial "active water" technologies on Escherichia coli O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 33, p. 232-238, 2013.

YEAGLE, P.L. Chapter 4: Detergents. **The Membranes of Cells**, e. 3, pg. 73-84, 2016.