

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CÂMPUS MEDIANEIRA

NAIELI MÜCKE

**SENSIBILIDADE CELULAR E DE BIOFILME DE *Enterococcus* sp. AOS
DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL**

MEDIANEIRA

2016

NAIELI MÜCKE

**SENSIBILIDADE CELULAR E DE BIOFILME DE *Enterococcus* sp. AOS
DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto Maia

MEDIANEIRA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M942s Mücke, Naieli

Sensibilidade celular e de biofilme de *Enterococcus* sp. aos desinfetantes de uso industrial. / Naieli Mücke – 2016.
77 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Luciana Furlaneto Maia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2016.

Inclui bibliografias.

1.Desinfecção e desinfetantes. 2. Educação sanitária. 3. Alimentos – Dissertações. I. Maia, Luciana Furlaneto, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn 9/1219



TERMO DE APROVAÇÃO

SENSIBILIDADE CELULAR E DO BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS SP.* AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL

Por

NAIELI MÜCKE

Essa dissertação foi apresentada às catorze horas do dia vinte e cinco de janeiro de dois mil e dezesseis, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelas professoras abaixo assinadas. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia (Orientadora – PPGTA)

Profa. Dra. Alane Tatiana Pereira Moralez (Membro Externo – UEL)

Profa. Dra. Emanuele Júlio de França (Membro Externo – UENP/CP)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu amado namorado Celso por todo amor, incentivo, confiança, compreensão, alegria e ajuda.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

À Professora Dra. Luciana Furlaneto Maia pela orientação, oportunidade e ensinamentos.

Aos alunos Mayara Ogaki, Marcia Regina Terra e Thiago Saito pela amizade, disponibilidade em ajudar e as palavras de carinho e ânimo.

À minha amiga Daneysa Lahis Kalschne pelo apoio, incentivo e amizade sincera.

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto pelos conselhos e contribuição para a realização desse trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Medianeira e Londrina e a Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

MÜCKE, Naieli. Sensibilidade celular e de biofilme de *Enterococcus* sp. aos desinfetantes de uso industrial. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2016.

Enterococcus sp. podem ser isolados de seres humanos, animais e ambiente; possuem alta tolerância a fatores extremos como pH, temperatura e concentração salina. Desempenham papel importante como cultura *starter* em vários produtos como iogurtes e queijos, além de serem produtores de enterocinas. Contudo, é crescente seu potencial como agentes causadores de sérias infecções, podendo adquirir alta resistência a antimicrobianos e biocidas. Os equipamentos na indústria alimentícia estão propensos à alta contaminação microbiológica devido à presença de substratos para os microrganismos, e quando não higienizados permitem que os microrganismos se desenvolvam até formarem biofilmes, contaminando o produto final. Este estudo teve por finalidade realizar o isolamento de cepas do gênero *Enterococcus* de equipamentos das linhas de processos de embutidos cárneos cozidos e de iogurtes, identificar através de técnicas moleculares as espécies dos isolados, verificar a suscetibilidade biocida a sete formulações de diferentes desinfetantes de uso industrial e ação destes sobre o biofilme. Nas amostras coletadas na linha de iogurtes não houve o crescimento de colônias indicativas. Das 36 amostras coletadas nas linhas de produção de embutidos cárneos cozidos, selecionou-se 40 colônias que ao submeter à avaliação genotípica, obtivemos que 70,0% (28 isolados) possuíam o gene *tuf* que identifica o gênero *Enterococcus* sp. Identificamos que 7,1% pertenciam aos gêneros *E. faecium*, 7,1% *E. gallinarum*, 7,1% *E. casseliflavus*/*E. flavescens* e 78,7% dos isolados não foram identificados ao nível de espécie com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo. Ao avaliar a ação de sanitizantes sobre células de *Enterococcus* sp. na presença de água verificou-se que nenhum produto utilizado conseguiu ser totalmente eficiente no controle do desenvolvimento dos enterococos em presença de água. Nos testes utilizando BHI e sanitizante os isolados apresentaram menor desenvolvimento na presença do sanitizante amônia quaternária D em todos os tempos, sendo que nos tempos 15 minutos, 1, 2, 3 e 24 horas não houve desenvolvimento. O maior desenvolvimento ocorreu na presença dos produtos dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e ácido peracético em todos os tempos, sendo que para os dois primeiros produtos todos os isolados foram resistentes em todos os tempos. Independente do tipo de sanitizantes e biofilme formado, nenhum agente químico foi eficaz na eliminação total das células de *Enterococcus*. Nota-se que os biofilmes formaram-se mesmo sobre as superfícies sanitizadas, mesmo que tenham sido utilizados as concentrações e tempo médios recomendados pelos fabricantes. É indispensável ressaltar que os resultados confirmam a importância de ações preventivas nas indústrias para evitar a resistência dos microrganismos a determinados compostos e maximizar a eficiência dos procedimentos de higienização aplicados.

Palavras-chave: Enterococos. Espécies. Desinfetantes. Suscetibilidade.

ABSTRACT

MÜCKE, Naieli. Cell sensitivity and *Enterococcus* sp. biofilm to disinfectants for industrial use. 2016. 77 f. Dissertation (Master in Food Technology) – Post Graduation Program in Food Technology, Federal University of Technology. Medianeira-PR, 2016.

The *Enterococcus* sp. may be isolated from humans, animals and environment. It presents high tolerance to extreme factors such as pH, temperature and salt concentration. It has an important role as a *starter* culture in different products such yogurts and cheeses, and as producers of enterocinas. However, its potential as agents of serious infections has increasing, especially because can acquire high resistance to antimicrobials and biocides. The food industry equipment's are willing to high microbiological contamination due to the presence of substrates for microorganisms. When dirty, allow the microorganisms grow and biofilm formation, contaminating the final product. The aim of this work was isolated the genus Enterococci strains of equipment's on pork cooked sausages and yogurts lines, identified through molecular techniques and check the biocide susceptibility of seven formulations of different industrial disinfectants and the action of these on the biofilm. On the yogurts line samples analyzed there was no grow of indicative colonies. Of the 36 samples analyzed in the sausage line, 40 colonies were selected to undergo genotypic evaluation, showing that 70.0% (28 isolates) had the *tuf* gene that identifies the genus *Enterococcus* sp. It was verified that 7.1% belonged to the genus *E. faecium*, 7.1% *E. gallinarum*, 7.1% *E. casseliflavus*/*E. flavencens* and 78.7% of the isolates were not identified to species level using the oligonucleotides used in this study. In assessing the sanitizing action on cells of *Enterococcus* sp. in the presence of water there was no product that could be used effectively on grow control of enterococci. In tests using BHI and sanitizing the isolates were less developed in the presence of quaternary ammonia sanitizer D at all times, and in the time 15 minutes, 1, 2, 3 and 24 hours there was no development. Further development occurred in the presence of chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid at all times, and for the first two products all isolates were resistant at all times. Regardless of the sanitizers and biofilm formed, no chemical agent was effective in complete elimination of *Enterococcus* cells. Note that biofilms were formed even on the sanitized surfaces even though the average concentration-time recommended by the manufacturer was used. Indispensable to emphasize that the results confirm the importance of preventive actions in the industries to avoid the resistance of microorganisms to certain compounds and maximize the efficiency of applied hygiene procedures.

Keywords: Enterococci. Species. Disinfectants. Susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

Parte 1:

- FIGURA 1** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Enterococcus* sp.15
- FIGURA 2** – GENES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *E. faecalis* ..17
- FIGURA 3** – FRAGMENTO DO FLUXOGRAMA DA LINHA DE PRODUÇÃO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS COZIDOS COM IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA COM O *SWAB*23
- FIGURA 4** – FRAGMENTO DO FLUXOGRAMA DA LINHA DE PRODUÇÃO DE IOGURTE COM IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS COLETA COM O *SWAB*24

Artigo 1:

- FIGURA 1** – FRAGMENTOS DOS FLUXOGRAMAS DAS LINHAS DE PRODUÇÃO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS COZIDOS (A) E PRODUÇÃO DE IOGURTE (B) COM IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA COM O *SWAB*42
- FIGURA 2** – PERCENTUAL DE ISOLAMENTO DE ENTEROCOCOS NOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA LINHA DE PRODUÇÃO DE EMBUTIDOS47

Artigo 2:

- FIGURA 1** – PERCENTUAL DE ISOLADOS DE *Enterococcus* sp. QUE APRESENTARAM DIFERENTES INTENSIDADES NA FORMAÇÃO DE BIOFILME ..67

LISTA DE TABELAS

Parte 1:

TABELA 1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS PARA <i>Enterococcus</i> sp.	26
TABELA 2 – PRINCÍPIO ATIVO, CONCENTRAÇÃO INDICADA PELO FABRICANTE E CONCENTRAÇÃO UTILIZADA DOS DESINFETANTES UTILIZADOS NOS TESTES DE ESTABILIDADE BIOCIDA E AÇÃO NO BIOFILME DE <i>Enterococcus</i> sp.	27

Artigo 1:

TABELA 1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPÉCIE-ESPECÍFICO PARA <i>Enterococcus</i> sp.	43
TABELA 2 – PRINCÍPIO ATIVO, CONCENTRAÇÃO INDICADA PELO FABRICANTE E CONCENTRAÇÃO UTILIZADA DOS DESINFETANTES UTILIZADOS NOS TESTES DE ESTABILIDADE BIOCIDA DE <i>Enterococcus</i> sp.	45
TABELA 3 – IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROCOCOS ISOLADOS A PARTIR DOS SWABS REALIZADOS NA LINHA DE PRODUÇÃO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS COZIDOS ATRAVÉS DO PCR	46
TABELA 4 – PERCENTUAL DE DESENVOLVIMENTO CELULAR DOS ISOLADOS DE ENTEROCOCOS EM ÁGUA E BHI CONTENDO SANITIZANTES	49

Artigo 2:

TABELA 1 – ISOLADOS DE ENTEROCOCOS DA LINHA DE PRODUÇÃO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS COZIDOS	64
TABELA 2 – PRINCÍPIO ATIVO, CONCENTRAÇÃO INDICADA PELO FABRICANTE E CONCENTRAÇÃO UTILIZADA DOS DESINFETANTES UTILIZADOS NOS TESTES DE AÇÃO SOBRE BIOFILME DE <i>Enterococcus</i> sp.	65
TABELA 3 – PERCENTUAL DE CÉLULAS VIÁVEIS NO BIOFILME E BIOFILME DESIDRATADO APÓS AÇÃO DOS SANITIZANTES	69
TABELA 4 – RESULTADOS DE DENSIDADE ÓPTICA DOS BIOFILMES FORMADOS APÓS 5 MINUTOS DE TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE COM OS SANITIZANTES ..	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 ENTEROCOCOS	13
3.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Enterococcus sp.</i>	14
3.3 ENTEROCOCOS EM ALIMENTOS	17
3.4 DETERGENTES E DESINFETANTES UTILIZADOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: MODO DE AÇÃO SOBRE MICRORGANISMOS	18
3.5 FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA E RESISTENCIA AOS DETERGENTES E SANITIZANTES	20
3.5.1 Resistência de biofilme a detergentes e desinfetantes	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 ISOLAMENTO DE <i>Enterococcus sp.</i>	22
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO GÊNERO	24
4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA ESPÉCIE	25
4.3.1 Extração de DNA.....	25
4.3.2 Identificação da Espécie	25
4.4 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS SANITIZANTES.....	26
4.5 AÇÃO DE SANITIZANTE EM BIOFILME DE <i>Enterococcus sp.</i>	28
4.5.1 Ação do sanitizante em biofilme	28
4.5.2 Ação dos sanitizantes em superfície de biofilme desidratado	28
4.5.3 Ação do sanitizante na formação de biofilme	29
REFERÊNCIAS	29
APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS	36
ARTIGO 1	37
<i>Enterococcus sp.</i> ISOLADOS DO PROCESSAMENTO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS SUÍNOS E SENSIBILIDADE CELULAR AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL	37
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1 ISOLAMENTO DE <i>Enterococcus sp.</i>	41
2.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE GÊNERO/ESPÉCIE	42
2.3 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS SANITIZANTES.....	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Enterococcus sp.</i> NA LINHA DE PRODUÇÃO DE EMBUTIDO CÁRNEO COZIDO	45
3.2 – AÇÃO BIOCIDA DE SANITIZANTES SOB CÉLULAS DE <i>Enterococcus sp.</i>	48
4 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	53
ARTIGO 2	59
PERFIL DE RESISTÊNCIA A AGENTES SANITIZANTES DE BIOFILMES FORMADOS POR ISOLADOS DE <i>Enterococcus sp.</i>	59
1 INTRODUÇÃO	62
2 MATERIAIS E MÉTODOS	63
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	63
2.2 AÇÃO DE SANITIZANTE EM BIOFILME DE <i>Enterococcus sp.</i>	64

2.2.1 Ação do sanitizante em biofilme	64
2.2.2 Ação dos sanitizantes em superfície de biofilme desidratado	65
2.2.3 Ação do sanitizante na formação de biofilme	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS DE <i>Enterococcus</i>	66
3.2 AÇÃO DE SANITIZANTE EM BIOFILME E BIOFILME DESIDRATADO.....	67
3.3 AÇÃO DO SANITIZANTE SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME	70
4 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Enterococcus sp. podem ser isolados de seres humanos, diversos animais e ambiente, e essa capacidade de habitar diversos locais se deve a sua alta tolerância a fatores extremos como pH, temperatura e concentração salina. Atualmente, considera-se que o gênero *Enterococcus* constitui um grupo heterogêneo de bactérias compreendendo mais de 54 espécies, com base na análise de sequências de DNA ribossomal (rDNA 16S). Este grupo apresenta as seguintes características bioquímicas: Gram-positivos, anaeróbios facultativos e catalase negativos, que toleram uma grande variedade de condições de crescimento, como meios hiper ou hipotônicos, ambientes alcalinos e ácidos e fermentam a lactose produzindo ácido lático.

Algumas espécies desempenham papel importante como cultura *starter* em vários produtos como iogurtes e queijos, além de serem produtores de enterocinas. Contudo, é crescente seu potencial como agentes causadores de sérias infecções, podendo adquirir alta resistência a antimicrobianos e biocidas, além de abrigar diversos fatores de virulência. Os enterococos, sobretudo as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são consideradas como importantes patógenos oportunistas, ou seja, provocam doenças em condições de imunossupressão do hospedeiro.

Em alimentos, enterococos podem tolerar a pasteurização e altas temperaturas de tratamento térmico de embutidos cárneos e em produtos lácteos podem estar associados à alta contaminação inicial do leite. Apesar de *Enterococcus* sp. serem relatados como causadores de infecções em humanos, ainda não há uma relação quanto à veiculação por alimentos.

Os equipamentos na indústria alimentícia estão propensos à alta contaminação microbiológica devido à matéria-prima cárnea e láctea conter elevados teores de proteínas e substratos para os microrganismos, e quando não higienizados permitem que os microrganismos se desenvolvam e até formem biofilmes, contaminando o produto final. Portanto, o processo de sanitização de equipamentos, eliminando e/ou diminuindo a carga microbiana, é fundamental e o estudo de microrganismos resistentes aos sanitizantes tem grande relevância científica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar *Enterococcus* sp. de equipamentos das linhas de processo de embutidos cárneos cozidos e de iogurtes, verificar a suscetibilidade de células planctônicas e de biofilmes à sanitizantes de uso industrial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar *Enterococcus* spp. de equipamentos das linhas de produção de iogurtes e embutidos cárneos cozidos;
- ✓ Proceder à identificação molecular ao nível de gênero e espécie;
- ✓ Determinar a sensibilidade dos isolados frente à sanitizantes de uso industrial;
- ✓ Determinar a ação biocida dos sanitizantes;
- ✓ Verificar a ação dos sanitizantes sobre a formação de biofilme, no biofilme formado e no biofilme desidratado de *Enterococcus* sp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENTEROCOCOS

Bactérias do gênero *Enterococcus* são descritas como produtoras de L-ácido láctico, homofermentativas, Gram-positivas, catalase negativa, anaeróbicas facultativas, produzem ácido L-láctico a partir de hexoses e se diferem dos demais cocos homofermentadores por apresentarem crescimento a 10 e 45°C, a pH 9,6, em presença de até 6,5% de NaCl e 40% de sais biliares (DOMIG; KNEIFEL; MAYER, 2003; FRANZ et al., 2003; GELSOMINO et al., 2001).

Mais de 54 espécies de *Enterococcus* são descritas, porém as espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus hirae* são as mais frequentemente encontradas devido à ampla distribuição no meio ambiente (EUZÉBY, 2015).

Enterococos são bactérias comensais que colonizam o trato digestório de uma ampla gama de hospedeiros vertebrados e, portanto, difundida no meio ambiente (FISHER; PHILLIPS, 2009). São consideradas bactérias autóctones, uma vez que liberadas no meio ambiente são capazes de colonizar diversos nichos, além de possuir capacidade de resistir e de se multiplicar em condições ambientais hostis, com grande potencial para contaminar águas e alimentos (IVERSEN et al., 2002).

Algumas espécies, incluindo os *E. faecalis* e *E. faecium* estão entre os mais importantes microrganismos adquiridos em ambiente hospitalar, são multirresistentes e podem causar infecções graves na corrente sanguínea, do trato urinário, da pele e dos tecidos moles (ARIAS; MURRAY, 2012). Enterococos são também aceitos como indicadores de contaminação fecal para as águas de recreação (USEPA, 2002), e têm sido empregados como indicadores de qualidade microbiológica de produtos frescos (JOHNSTON et al., 2006).

Fatores de virulência de enterococos incluem a proteína extracelular (Esp) e substâncias de agregação (Agg), ambos ajudam na colonização do hospedeiro. A patogenicidade dos enterococos em ambientes hospitalares surgiu nos últimos anos, bem como o aumento da resistência aos antibióticos glicopeptídeos (FISHER; PHILLIPS, 2009).

Estes microrganismos hidrolisam a esculina em presença de alta concentração de bile. Os produtos da hidrólise da esculina reagidos com íons ferro presentes no meio de cultura levam à formação de esculina evidenciada pela presença de halos escuros ao redor das

colônias de enterococos (DOMIG; KNEIFEL; MAYER, 2003), o que pode ser utilizado para distinguir enterococos de outros cocos Gram-positivos e catalase negativo (FACKLAM; SAHM; TEIXEIRA, 1999). *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus durans* e *E. hirae* são tolerantes ao telurito e utilizam-se de piruvato para produzir ácido a partir de sorbitol, e todas as cepas de *E. faecium* também podem produzir ácido a partir de arabinose (FACKLAM; ELLIOT, 1995).

As espécies do gênero *Enterococcus* podem ser identificadas por testes fenotípicos convencionais ou diversos testes moleculares na sua maioria baseados em reações em cadeia da polimerase (PCR) (FACKLAM, 2002).

A contaminação por enterococos em alimentos de origem animal (carnes, leites e derivados) pode ser endógena ou exógena dependendo se a origem das bactérias for do próprio animal ou do meio ambiente, incluindo-se água, solo, equipamentos e manipuladores, que têm contato com os alimentos durante a produção (TIECCO, 1992). Uma vez presentes nos alimentos crus, esses microrganismos são capazes de sobreviver e de se multiplicar durante algumas etapas de produção de alimentos como, por exemplo, a pasteurização, a fermentação e a refrigeração (GIRAFFA et al., 2002).

3.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Enterococcus* sp.

Os biofilmes microbianos são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de EPS, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002). Como etapas importantes para a sua formação, são descritas as adesões iniciais, passando os microrganismos de seu estilo de vida planctônico ao sésil, à formação de microcolônias, à maturação e ao destacamento de células do biofilme, retornando estas a seu estilo de vida planctônico (Figura 1).

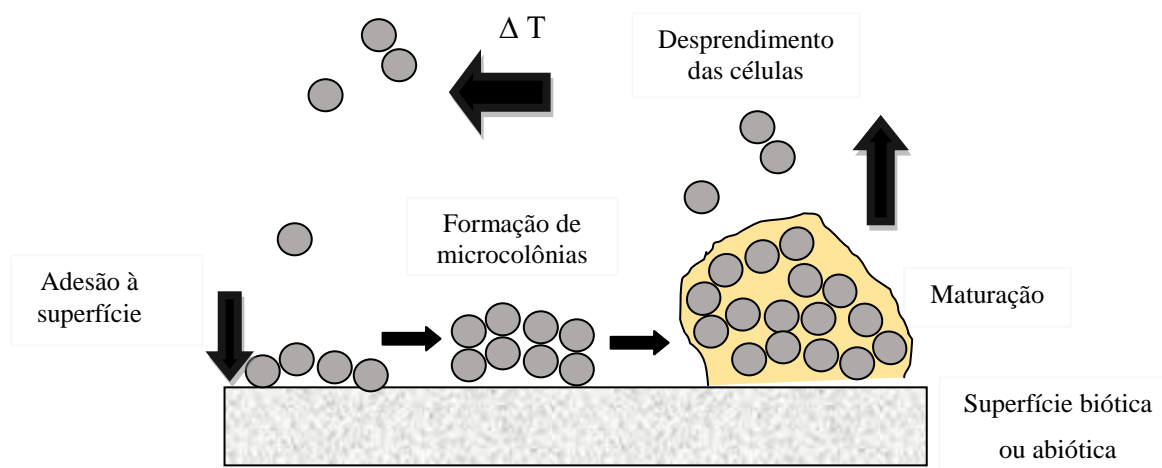


Figura 1 – Representação esquemática da formação de biofilme em *Enterococcus sp.*
Fonte: Autores.

Para Watnick e Kolter (2000) os microrganismos se aproximam da superfície, formando uma associação provisória com a própria superfície e/ou outros microrganismos. Ocorre a formação de microcolônias e produção de exopolissacarídeos (EPS), que passam a estabilizar a associação. Após esta etapa forma-se uma estrutura tridimensional que consiste no biofilme microbiano.

Vários elementos exercem influência no processo de adesão e formação de biofilmes bacterianos, como hidrofobicidade, carga da superfície, temperatura, presença de substrato, aparatos celulares como pili, fímbrias e flagelos, diferenças existentes entre as superfícies utilizadas no processamento de alimentos e a configuração dos equipamentos em relação à facilidade ou não de limpeza e sanitização (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Segundo Pereira et al. (2000), a topografia das superfícies, como sua composição, rugosidade e porosidade podem ser determinantes para este processo.

Andrade, Bridgeman e Zottola (1998) afirmam que *Enterococcus sp.* apresentam capacidade de aderência em aço inoxidável. Alguns autores relacionam a capacidade de adesão com a expressão do gene *esp* (HEINKENS et al.; 2007; TOLEDO-ARANA et al., 2001) e *gelE* (MOHAMED et al., 2004).

O metabolismo de carboidratos também regula a produção de biofilme entre as várias bactérias Gram-positivas, incluindo *E. faecalis*, sendo que um regulador transcricional dependente de glicose pode controlar o gene *fsr*, que medeia a produção de biofilme pela protease, gelatinase e serina protease (PILLAI et al., 2004). A Figura 2 apresenta os genes envolvidos na formação do biofilme em *E. faecalis*.

A formação de biofilme ocorre em variados tipos de ambientes bióticos ou abióticos. Pesquisas sobre a sua formação em superfícies utilizadas na produção de alimentos vêm recebendo destaque, principalmente no que se refere aos malefícios de sua presença. Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores de alimentos, podendo comprometer a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (BERESFORD; ANDREW; SHAMA, 2001; CHEN et al., 2007; FUSTER-VALLS et al., 2008; MANSFELD, 2007).

Outra problemática envolvendo a formação de biofilme na indústria de alimentos é a capacidade das células sésseis serem resistentes aos agentes empregados nos procedimentos de higienização. Alguns pesquisadores relatam que as células sésseis chegam a ser de 500 a 1.000 vezes mais resistentes que as células planctônicas (DRENKARD, 2003). Um dos grandes responsáveis por conferir esta proteção é a matriz de EPS, que age como barreira física, impedindo que os agentes sanitizantes cheguem a seus sítios de ação. O EPS é também capaz de adsorver cátions, metais e toxinas, conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação. Devido a este agravante, conhecer as condições que propiciam a formação de biofilme e as suas fragilidades é primordial para que estratégias de controle, mais econômicas e eficazes, sejam dimensionadas para a eliminação de mais esta possibilidade de introdução de microrganismos na cadeia alimentar (HERRERA et al., 2007).

Gene/locus	Protein/function	Reference
<i>atn</i>	<u>A</u> utolysin	Mohamed <i>et al.</i> (2004)
<i>bee</i>	<u>B</u> iofilm <u>e</u> nhancer in <i>Enterococcus</i> /a putative cell wall-anchored protein	Tendolkar <i>et al.</i> (2006)
<i>bop</i>	<u>B</u> iofilm <u>o</u> n <u>p</u> lastic surface/a putative sugar-binding transcriptional regulator	Hufnagel <i>et al.</i> (2004)
<i>dltA</i>	<u>D</u> -alanine lipoteichoic acid/ <u>D</u> -alanine- <u>D</u> -alanyl carrier protein ligase	Fabretti <i>et al.</i> (2006)
<i>ebpA, ebpB, ebpC</i>	<u>E</u> ndocarditis and <u>b</u> iofilm-associated <u>p</u> ili	Nallapareddy <i>et al.</i> (2006)
<i>ebpR</i>	Transcriptional regulator of <i>ebpABC</i>	Bourgogne <i>et al.</i> (2007)
<i>epa (orfde4)</i>	<u>E</u> nterococcal <u>p</u> olysaccharide <u>a</u> ntigen/a putative glycosyltransferase involved in polysaccharide synthesis	Mohamed <i>et al.</i> (2004)
<i>esp</i>	<u>E</u> nterococcal <u>s</u> urface <u>p</u> rotein	Toledo-Arana <i>et al.</i> (2001); Tendolkar <i>et al.</i> (2004, 2006)
<i>etaR</i>	Enterococcal two-component system regulator	Mohamed <i>et al.</i> (2004)
<i>fsrA, fsrB, fsrC</i>	<i>E. faecalis</i> <u>r</u> egulator/two-component quorum-sensing signal transduction system, regulates the expression of gelatinase and serine protease	Mohamed <i>et al.</i> (2004, 2006); Pillai <i>et al.</i> (2004); Hancock & Perego (2004)
<i>gelE</i>	Secretory metalloprotease gelatinase E	Mohamed <i>et al.</i> (2004); Kristich <i>et al.</i> (2004); Hancock & Perego (2004)
<i>salA</i>	<u>S</u> ecretory <u>a</u> ntigen-like A	Mohamed <i>et al.</i> (2006)
<i>salB</i>	<u>S</u> ecretory <u>a</u> ntigen-like B/cell-shape determinant	Mohamed <i>et al.</i> (2006)
<i>srtC</i>	Sortase C/an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall	Nallapareddy <i>et al.</i> (2006)

Figura 2 – Genes envolvidos na formação de biofilme de *E. faecalis*.

Fonte: MOHAMED et al., (2007).

3.3 ENTEROCOCOS EM ALIMENTOS

Nos alimentos, os *Enterococcus* sp. podem ser encontrados em carnes, legumes, leite e produtos fermentados como os queijos, nos quais desenvolvem um importante papel no processo de maturação e enriquecimento do sabor. Algumas espécies de enterococos são utilizadas na manufatura de alimentos, porém a falta de conhecimento sobre seus fatores de virulência gera insegurança na utilização de cepas deste gênero como culturas fermentadoras e probióticas (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; GIRAFFA, 2003).

Enterococcus têm sido utilizados como probióticos para melhorar o equilíbrio microbiano do trato intestinal de seres humanos e animais (FRANZ et al., 2003). São capazes de reduzir o LDL colesterol pela ativação do sistema enzimático hepático. A espécie *E. faecium* destaca-se dentre as demais por exercer tais funções de maneira mais acentuada, sendo ainda relacionada à atividade anticarcinogênica (SIVIERI et al., 2007).

As atividades prejudiciais dos enterococos estão associadas com a deterioração de alimentos e a capacidade de causar doença nos seres humanos. Ainda, em produtos acabados pode ser considerado como indicador de contaminação fecal (STILES; HOLZAPFEL, 1997).

Frequentemente presentes em leite, as bactérias do gênero *Enterococcus* podem contaminá-lo de diversas maneiras, por contato direto com fezes de animais ou por contato indireto através de água contaminada, ar ambiente, pelo de animal ou equipamentos de ordenha e armazenamento (GELSOMINO et al., 2001).

Enterococcus ocorrem naturalmente como cultura não *starter* em grande variedade de queijos produzidos tanto a partir de leite cru como pasteurizado, devido ao fato de ser um microrganismo termodúrico capaz de resistir à pasteurização, refrigeração e ao processo de maturação. Nos queijos podem ser encontrados naqueles produzidos com leite cru e/ou pasteurizado e os seus valores dependem do grau de contaminação do leite, do tipo de queijo e a tecnologia aplicada (GIRAFFA, 2003). Estes microrganismos são frequentemente isolados de salsichas fermentadas, queijos, leite e derivados (MANNU et al., 2003). A recuperação e a persistência dos enterococos durante o processo de maturação de queijos pode ser atribuída à sua ampla gama de temperatura de crescimento, a sua tolerância ao calor, a uma ampla faixa de pH e sal (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006).

Em carnes, enterococos tem um alto potencial de contaminação no momento de abate, devido à sua presença no trato gastrointestinal de animais, como porcos, gado, aves, que provêm uma gama de produtos para alimentação. Mas, os enterococos podem contaminar não apenas as carnes cruas, mas também estão associados com carnes processadas. O aquecimento de carnes processadas durante a produção pode conferir uma vantagem seletiva aos enterococos, porque essas bactérias estão entre os mais termotolerantes das bactérias não esporulantes (MAGNUS et al., 1988).

3.4 DETERGENTES E DESINFETANTES UTILIZADOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: MODO DE AÇÃO SOBRE MICRORGANISMOS

Um dos elementos cruciais para o processamento de alimentos atual é a segurança dos produtos, evitando inclusive a perda de produção e, principalmente, a perda de confiança dos consumidores (DONK et al., 2004).

Segundo a RDC nº 14 os sanitizantes e desinfetantes utilizados nas indústrias alimentícias permitidos são somente as substâncias constantes da lista do Code of Federal Regulation (CFR) Nº 21 parágrafo 178.1010 e as da Diretiva Nº 98/8/CE, obedecendo às respectivas restrições e suas atualizações (BRASIL, 2007).

Na sanitização, removem-se os microrganismos até níveis aceitáveis pela legislação, podendo ser realizada tanto por métodos físicos (calor, radiação), quanto por métodos químicos (compostos clorados, iodados, ácidos orgânicos, entre outros). A redução do número de microrganismos é fundamental em plantas de alimentos, onde superfícies úmidas favorecem o crescimento destes (MASSAGUER, 2005).

Os sanitizantes utilizados para a limpeza devem ser escolhidos por sua eficiência na remoção de sujidades, pelo seu efeito sobre os equipamentos, superfícies, tratabilidade dos efluentes industriais gerados e também sobre os operadores, além ser facilmente enxaguado, fácil manuseio e utilização e principalmente não conferir sabor e odor estranho ao alimento processado ou ao equipamento sanitizado (MASSAGUER, 2005; NASCIMENTO et al., 2010). Para uma limpeza eficiente é imprescindível saber a concentração, temperatura, tempo de exposição e ação mecânica adequada (NASCIMENTO et al., 2010).

Podemos destacar entre os principais sanitizantes utilizados na indústria de alimentos o ácido peracético, cloraminas orgânicas, clorexidina, compostos de amônia quaternária, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, iodóforos e o peróxido de hidrogênio (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

Os halogênios, particularmente o iodo e o cloro, são agentes antimicrobianos eficazes, tanto isoladamente quanto como constituintes de compostos inorgânicos e orgânicos. Na indústria de alimentos as soluções de dióxido de cloro são muito utilizadas, uma vez que, não deixam odores e sabores residuais, além de possuir amplo espectro de atividade (TORTORA et al., 2012). Os hipocloritos são considerados mais efetivos aos microrganismos Gram-negativos que frente aos Gram-positivos. O cloro reage com as proteínas da membrana celular formando composto N-clorados, que afetam o transporte de nutrientes ao interior da célula e causam o vazamento dos compostos celulares para o exterior das células. Já o ácido hipocloroso pode entrar na célula e oxidar os grupos sulfidrílicos e as enzimas envolvidas no metabolismo celular podendo causar a morte da célula, ou também provocar mutação nas bases purínicas e pirimidínicas do DNA (MASSAGUER, 2005).

Os compostos de amônia quaternária atraem compostos carregados negativamente, como bactérias e proteínas, formam agregados iônicos, mudam a condutividade e tensão superficial, solubilizam e desnaturam proteínas, desagregam a membrana celular, liberam nitrogênio e material fosfórico (MASSAGUER, 2005). No mecanismo proposto por Carmona-Ribeiro et al. (2006) as superfícies catiônicas poderiam alterar a conformação e impedir o funcionamento de proteínas e canais de membrana, pelas interações com a cabeça

polar do DOBAD (lípeo catiônico sintético, com grande estabilidade química) acarretando a morte bacteriana.

O ácido peracético apresenta eficiência frente a bactérias esporuladas, leveduras, fungos e vírus, inclusive os fagos. Recomendável aplicar até temperatura máxima de 50-60°C para evitar decomposição do princípio ativo. Os ácidos graxos facilitam a penetração dentro da parede celular e da biomembrana devido à mistura de ácido peracético com ácido peroctanóico. O grupo peróxido ligado aos ácidos graxos destroem a membrana da célula. A oxidação quebra as ligações sulfidrílicas e a atividade superficial afeta a permeabilidade da membrana (MASSAGUER, 2005).

3.5 FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS DETERGENTES E SANITIZANTES

Os agentes químicos são utilizados para controlar o crescimento de microrganismos em tecidos vivos e objetos inanimados, no entanto poucos destes proporcionam a esterilidade, a maioria deles apenas reduz as populações microbianas em níveis ou removem as formas vegetativas de patógenos em objetos. Muitos biocidas tendem a ser mais eficientes contra bactérias Gram-positivas, enquanto grupo, do que bactérias Gram-negativas, uma vez que estes possuem uma camada externa de lipopolissacarídeos (TORTORA et al., 2012), os ideais devem ser aprovados pelos órgãos competentes, ter um amplo espectro de atividade antimicrobiana, ser capaz de destruir rapidamente os microrganismos, ser estável sob diversas condições de uso e apresentar baixa toxicidade e corrosividade (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

A utilização incorreta dos sanitizantes, em concentrações inadequadas, pode promover a seleção de algumas espécies bacterianas resistentes (GRAM et al., 2007). Pereira et al. (2000) indicam ainda como interferentes na adesão ligados a topografia da superfície, a composição, rugosidade e porosidade. Os equipamentos e utensílios a serem utilizados durante o processamento de alimentos devem ser desenhados, construídos e instalados de forma adequada, para que se possa assegurar a higiene e permitir à fácil e completa limpeza e sanitização (BRASIL, 1997). Russel (1992) afirma ainda que a temperatura e tempo de contato, a concentração do produto, os resíduos da superfície, o pH, as propriedades físico-

químicas da água e substâncias de inativação, especialmente a matéria orgânica podem influenciar na ação dos produtos sanitizantes.

A hidrofobicidade também está envolvida na adesão de microrganismos em superfícies, está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa dos microrganismos, as interações poderão influenciar a adesão, seja em superfícies de processamento ou na própria superfície do alimento (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

3.5.1 Resistência de biofilme a detergentes e desinfetantes

Sob condições favoráveis as bactérias podem aderir e se reproduzir e, quando não removidas de forma eficiente, podem promover a formação dos biofilmes bacterianos (BOWER; McGUIRE; DAESCHEL, 1996).

Após a formação do biofilme, os microrganismos que se encontram em seu interior são protegidos da remoção quando expostos ao escoamento de líquidos, alta turbulência e à ação de agentes químicos como os utilizados nos procedimentos de higienização (CLONTZ, 2008).

O *quorum sensing* (QS), sistema de comunicação célula-célula, é outro fator que recentemente tem sido considerado de grande importância para a formação de biofilmes microbianos. Neste sistema as bactérias sintetizam compostos sinalizadores de baixo peso molecular, denominados de autoindutores (AIs), que irão modular e influenciar a formação do biofilme, modulando também outras funções como esporulação, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de proteases e pigmentação, além de favorecer o acesso a nutrientes (VIANA, 2006).

CASTRO (2012) ao avaliar a eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹, ácido peracético a 300 mg.L⁻¹ e digluconato de clorexidina a 400 mg.L⁻¹ sobre a formação de biofilme de *E. faecium*, *E. faecalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e pela interação destes, em superfície de aço inoxidável, a 25 °C por três dias de armazenamento observou que houve a redução na contagem dos biofilmes formados por *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e pela junção destes microrganismos, mas estes não foram eliminados, embora os sanitizantes tenham sido utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes e frequentemente utilizadas nas indústrias de alimentos. Jessen e Lammert (2003) explicam que a remoção de microrganismos de superfícies de

contato torna-se muito mais complicada após a formação do biofilme, sendo mais eficiente adotar várias ações combinadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DE *Enterococcus* sp.

O isolamento de *Enterococcus* sp. realizou-se com auxílio de *swab* a partir de equipamentos envolvidos no processamento de iogurtes e embutidos cárneos cozidos.

Para a linha de processo de embutidos a coleta das amostras realizou-se no início, meio e fim de produção em dois dias distintos (considerando o início logo após a sanitização antes do início do processo). Na linha de produção de iogurtes foi realizado no período da noite em dois dias distintos (devido fluxo contínuo de produção os equipamentos são higienizados em etapas, selecionou-se equipamentos após a higiene e no final de produção), em janeiro de 2014.

A amostragem compreendeu cinco partes distintas dos equipamentos das linhas de produção, previamente selecionadas com base na área de contato das matérias-primas nos equipamentos destacados nas Figuras 3 e 4. Para a linha de iogurtes os equipamentos selecionados foram: bicos de envase (total de 5), esteiras de produtos, tubulação de resfriamento de produto (entrada e saída do trocador de calor), fermenteiras (total de 4), tubulações da bomba positiva de envase. Para a linha de embutidos: moedores (total de 2), tanque de PVC, carrinho de inox, embutideiras (total de 3), misturadeiras (total de 2) e silo de cura de massa. Foram coletadas, no total, 36 amostras na linha de embutidos e 24 na linha de iogurtes.

Para o *swab* utilizou-se um palito de polipropileno estéril de 15 cm com algodão especial de alta absorção numa das extremidades, passando no equipamento em zig zag nos sentidos de cima para baixo, da direita para esquerda, do canto superior esquerdo para o inferior direito e do canto inferior esquerdo para o superior direito, totalizando 100 cm², numa superfície de aproximadamente 20 cm² a cada ponto coletado utilizando molde de inox esterilizado, armazenando este palito em um tubo de ensaio estéril com tampa de rosca

contendo 3 mL de água peptonada 0,1% (v/v) e transportados até o laboratório em caixas de isopor sem refrigeração. Os tubos foram incubados a 37 °C por 18 h.

Após o período de incubação, uma alçada foi semeada em estria na superfície de ágar canamicina esculina azida (KEA) (Isofar), seguido de incubação a 37 °C por 24 h. Selecionaram-se as colônias indicativas de *Enterococcus* spp. (cor negra indicativa de hidrólise da esculina na presença de bile), estas foram repassadas para placas com meio ágar infusão cérebro e coração (BHI) (Himedia), divididas em forma de pizza e numeradas.

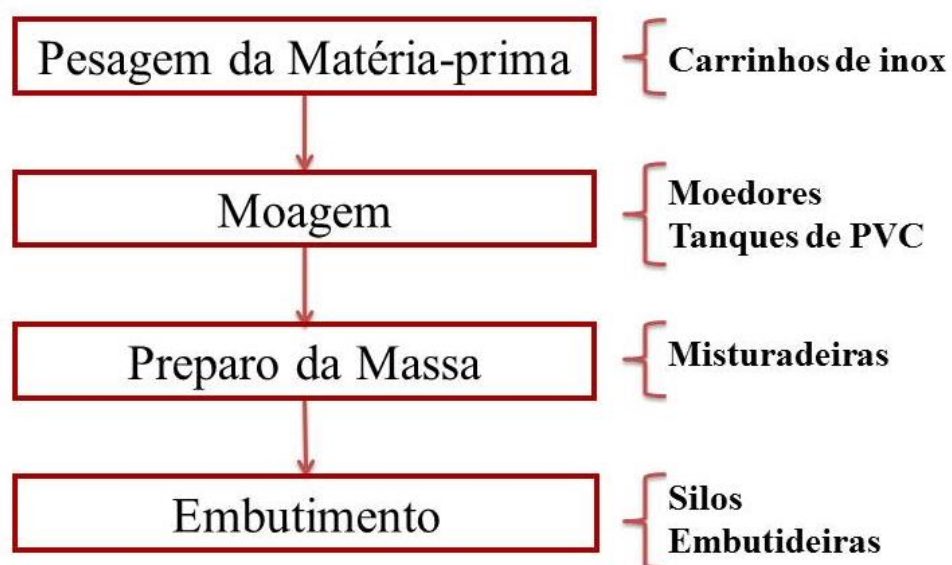


Figura 3 – Fragmento do fluxograma da linha de produção de embutidos cárneos cozidos com identificação dos pontos de coleta com o *swab*.

Fonte: Autor (verificação *in loco*)

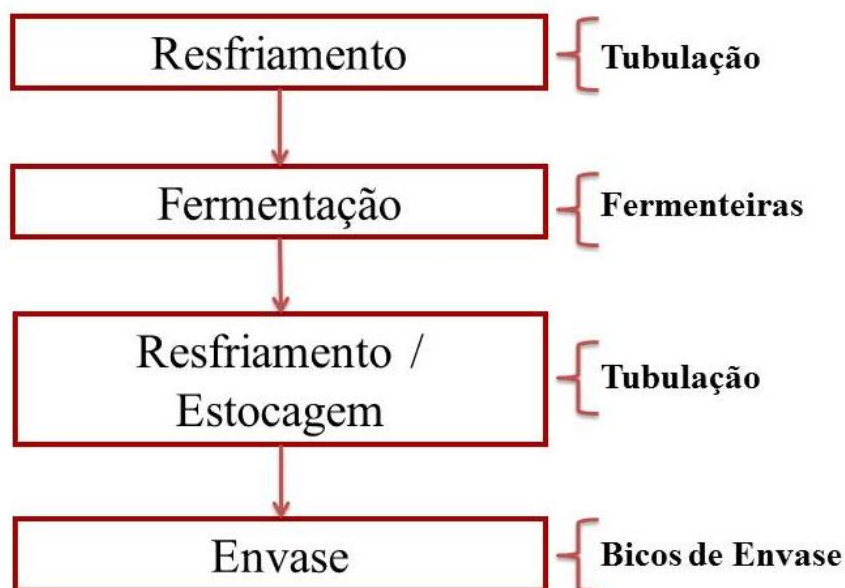


Figura 4 – Fragmento do fluxograma da linha de produção de iogurte com identificação dos pontos coleta com o swab.

Fonte: Autor (verificação *in loco*)

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO GÊNERO

Para identificação quanto ao gênero, às amostras bacterianas foram submetidas aos testes fisiológicos convencionais: método de Gram, produção da catalase, crescimento bacteriano a 10 °C e 40 °C e em 6,5% de NaCl seguindo recomendações de Facklam et al. (1999).

A partir de crescimento bacteriano em ágar BHI, foram realizados esfregaços em lâminas de vidro e estes submetidos ao método de coloração de Gram. As características morfotintoriais das células foram observadas ao microscópio óptico com auxílio de objetiva de 100X (imersão).

A produção da enzima catalase foi verificada por metodologia convencional, em lâmina de vidro. A partir de um crescimento em ágar BHI (cultura de 18 a 24 h a 37 °C), uma suspensão bacteriana foi depositada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ a 3% v/v). A ausência de formação de bolhas foi indicativa de reação negativa, característica dos enterococos.

A capacidade de multiplicação dos enterococos em caldo BHI foi realizada nas temperaturas de 10 °C e 45 °C de incubação, meio com pH 9,6 e meio contendo 6,5% de NaCl. A turvação dos meios, após incubação por 24 h a 37 °C foi indicativa de teste positivo.

4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA ESPÉCIE

4.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA total seguiu o método descrito por Marques e Suzart (2004) adaptado. Os isolados de *Enterococcus* sp. foram cultivados em tubos de rosca contendo 3 mL de meio BHI caldo (Himedia), incubados a 37 °C, sob agitação de 180 rpm, por 18 h. Após o crescimento, 1 mL de cada cultivo foi adicionado a microtubos e centrifugado por 10 min a 10.000 rpm. O sedimento foi ressuspendido em 300 µL de água ultrapura esterilizada. A suspensão de células foi aquecida a 100 °C por 30 minutos e posteriormente, submetida a um choque térmico em banho de gelo por 5 minutos e novamente centrifugada. Do sobrenadante, contendo o DNA total, retirou-se 150 µL que posteriormente foi armazenado em freezer a -20 °C.

4.3.2 Identificação da Espécie

Os isolados de *Enterococcus* sp. foram confirmados e identificados ao nível de gênero e espécie pela reação de PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Dutka-Malen et al. (1995). Os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam os genes *ddl*_{*E.faecalis*} e *ddl*_{*E.faecium*}, correspondem respectivamente à identificação de *E. faecalis* e *E. faecium* (Tabela 1). Enquanto os oligonucleotídeos para os genes *vanC-1*, *vanC-2* e *vanC-3* são específicos para *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*/*E. flavescens*, respectivamente (DUTKA-MALEN et al., 1995).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores espécie-específico para *Enterococcus* sp.

Gene	Sequência nucleotídica (5'-3')	Ta (°C)	Tamanho do produto (bp)	Referências
<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGAG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	56	112	KE et al. (1999)
<i>vanC-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	56	822	
<i>vanC-2</i> , <i>vanC-3</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	56	439	Dutka-Malen et al.
<i>ddl_{E.faecalis}</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	56	941	(1995)
<i>ddl_{E.faecium}</i>	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	56	550	

Legenda: Ta (°C), temperatura de anelamento; gene *tuf*, *Enterococcus* sp.; *vanC-1*, *E. gallinarum*; *vanC-2*, *vanC-3*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*.

As reações foram realizadas em termociclador (Techne-TC3000), em um volume final de 20 µL, contendo 10 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (forward e reverse) e 2,5U Taq DNA polimerase.

O termociclador foi programado para realizar uma desnaturação de 94 °C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de 95 °C a 30 segundos, anelamento a 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. O controle negativo continha todos os reagentes, porém sem a amostra de DNA. Os produtos resultantes da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Loccus). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de 1KB DNA plus (Amersham Pharmacia Biotech).

4.4 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS SANITIZANTES

Os isolados confirmados foram submetidos ao teste de suscetibilidade biocida. Para tanto, sete formulações de diferentes compostos químicos foram utilizadas (Tabela 2). A ação

biocida foi avaliada em duas diferentes condições, sendo na presença de matéria orgânica, utilizando meio BHI e na presença de água.

Os isolados foram semeados em ágar Mueller-Hinton (MH) (Himedia) e incubados a 37 °C por 18 h. Uma porção da colônia foi selecionada e transferida para tubos contendo água estéril até turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/ml).

As concentrações de trabalho dos sanitizantes foram utilizadas de acordo com o recomendado pelo fabricante. Os testes foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato. Para tanto, 200 µL de água ou BHI com a cultura de *Enterococcus* foram acrescentados em cada poço da placa e em seguida acrescidos às soluções de sanitizantes conforme concentrações de trabalho. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. O desenvolvimento microbiano foi avaliado por densidade óptica (DO) nos tempos 0, 15 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 3 h e 24 h. Controle negativo foi o meio sem a presença da bactéria.

Para calcular a concentração inibitória mínima, a leitura da DO foi normalizada. Para a normalização, a DO mensurada no tempo 0 de cada poço, foi denotado como DO *background*, e subtraído das leituras posteriores. Se houve diferença na DO acima do *background*, este foi considerado positivo para crescimento bacteriano.

A fim de verificar a viabilidade celular, uma alíquota de 10 µL foi retirada de cada poço em cada tempo e depositada na superfície de ágar KEA. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 h.

Tabela 2 – Princípio ativo, concentração indicada pelo fabricante e concentração utilizada dos desinfetantes utilizados nos testes de estabilidade biocida e ação no biofilme de *Enterococcus*.

Princípio Ativo	Concentração Indicada pelo Fabricante	Concentração Utilizada
Espumante alcalino clorado H	2,0 %	20 µl/mL
Amônia Quaternária D	10,0 %	100 µl/mL
Dióxido de Cloro	100 ppm	1 µl/mL
Hipoclorito de sódio	5 ppm	0,05 µl/mL
Amônia Quaternária M	1,5 %	15 µl/mL
Ácido Peracético	0,30 %	3 µl/mL
Espumante alcalino clorado A	3,0 %	30 µl/mL

Fonte: Deion; Mundial Química; AEB Group; Higex; 2013.

4.5 AÇÃO DE SANITIZANTE EM BIOFILME DE *Enterococcus* sp.

4.5.1 Ação do sanitizante em biofilme

A formação do biofilme em superfície de poliestireno foi realizada de acordo com metodologia descrita por Stepanovic et al. (2000). Os isolados de enterococos foram cultivados a 37 °C por 24 h em meio BHI suplementado com 1% de glucose. A densidade celular foi ajustada até turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/ml), e uma alíquota de 200 μ L de cada suspensão foi transferida para placas de 96 poços de fundo chato. O controle negativo foi o inóculo de caldo sem a presença da bactéria. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, o meio e células planctônicas foram removidas das placas, e os poços lavados com água destilada estéril por três vezes.

Em seguida, foi adicionado o sanitizante nas mesmas concentrações descritas no item 4.4. Nos tempos 5, 10, 15, 30 e 60 min o sanitizante foi removido e os poços lavados com água destilada estéril por três vezes. A viabilidade celular foi observada utilizando o sal XTT [2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide], que produz uma coloração vermelho-alaranjado quando reduzido. O sal XTT foi preparado como solução saturada (1 mg/ml em PBS), esterilizado por filtração e estocado a -20 °C. A solução utilizada foi diluída na concentração final de 0,5 mg/ml.

A mudança na coloração foi mensurada em DO de 490 nm. Presença de coloração vermelha-alaranjada indicou viabilidade celular (células vivas). Poços sem cultura bacteriana foram considerados controles negativo.

4.5.2 Ação dos sanitizantes em superfície de biofilme desidratado

Para este ensaio, a formação do biofilme seguiu conforme descrito no item 4.6.1. Após a primeira lavagem para remoção do meio e células planctônicas, as placas de 96 poços foram mantidas em fluxo laminar com circulação de ar, por um período de 4 h. Na sequência foi adicionado o sanitizante e seguiu-se o protocolo descrito anteriormente.

4.5.3 Ação do sanitizante na formação de biofilme

A ação do sanitizante como inibidor da formação do biofilme também foi avaliado. O procedimento seguiu como descrito anteriormente, contudo, antes do inóculo bacteriano, os poços foram tratados com a solução sanitizante por um período de 5 minutos.

REFERÊNCIAS

AEB, Group. Disponível em: <<http://www.aeb-group.com/or4/or?uid=aeb.main.index&oid=188207>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

ANDRADE, N. J.; BRIDEGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p. 833-838, 1998.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2008, 410 p.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.

BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1000-1005, 2001.

BOWER, C. K. M; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 152-157, 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº326, de 30 de julho de 1997. Regulamentos Técnicos sobre Inspeção Sanitária, boas Práticas de Produção/Prestação de Serviços e Padrão de Identidade e qualidade na Área de alimentos. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago. 1997.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 14, de 28 de Fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 Mar. 2007.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; VIEIRA, D. B.; LINCOPAN, N. Cationic surfactants and lipids as anti-infective agentes. **Anti-Efective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 33-54, 2006.

CASTRO, Marcília Santos Rosado. **Enterococcus spp. e Pseudomonas spp. isolados de ambiente de processamento de produtos lácteos: identificação, formação de biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes**. 2012. 225 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D. M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 249-254, 2007.

CLONTZ, Lucia. A contaminação microbiana pode causar uma redução de fluxo e corrosão das linhas do sistema de água. **Revista Controle de Contaminação**, n. 109, 2008.

DEION, Indústria e Comércio de Detergentes Ltda. Disponível em: <<http://www.deiondetergentes.com.br/index.htm>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

DOMIG, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 147-164, 2003.

DONK, D. P. V.; GAALMAN, G. Food safety and hygiene systematic layout planning of food processes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 82, n. 11, p. 1485–1493, 2004.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DRENKARD, Eliana. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 5, n. 3, p. 1213-1219, 2003.

GIRAFFA, Giorgio. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 163 – 171, 2002.

GIRAFFA, Giorgio. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, 2003.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, 2007.

HEINKENS, E.; BONTEN, M. J. M.; WILLEMS, R. J. L. Enterococcal surface protein *Esp* is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8233-8240, 2007.

HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2007.

HIGEX, Smart cleaning. Disponível em: <<http://www.higex.com.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

IVERSEN, A.; KÜHN, I.; FRANKLIN, A.; MÖLBY, R. High prevalence of vancomycin resistant enterococci in Swedish sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2838–2842, 2002.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and Desinfection in Meat Processing Plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 265-269, 2003.

JOHNSTON, L. M.; JAYKUS, L. A.; MOLL, D.; ANCISO, J.; MORA, B.; MOE, C. L. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 83-95, 2006.

KE, D.; PICARD, F. J.; MARTINEAU, F.; MÉNARD, P. H. R.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3497-3503, 1999.

MAGNUS, C. A.; MCCURDY, A. R.; INGLEDEW, W. M. Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 21, n. 2, p. 209–212, 1988.

MANNU, L. A.; PABA, E.; DAGA, R.; COMUNIAN, S.; ZANETTI, I.; DUPRE, L. A. SECHI. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 291–304, 2003.

MANSFELD, Florian. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.

MARQUES, E. B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 1069–1073, 2004.

MASSAGUER, Pilar Rodriguez de. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, p. 191-205, 2005.

MOHAMED, J. A.; HUANG, W. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581–1588, 2007.

MOHAMED, J. A.; HUANG, W.; NALLAPAREDDY, S. R.; TENG, F.; MURRAY, B. E. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3658–3663, 2004.

MUNDIAL QUÍMICA. Disponível em: < <http://mundialquimica.com.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como Controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v. 2, n. 1, p. 11-13, Junho/2010.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of a anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 181-186, 2000.

PILLAI, S. K.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. JR; MURRAY, B. E.; INOUYE, R. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 5, p. 967–970, 2004.

RUSSELL, John B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 5, p. 363-370, 1992.

SIVIERI, K.; CANO, V. P. S.; VALENTINI, S. R.; ROSSI, E. A. Demonstration of the cellular viability and safety of *Enterococcus faecium* CRL 183 in long-term experiments. **Le Lait**, v. 87, n. 1, p. 59-69, 2007.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, Karlsruhe, v. 36, n. 1, p. 1-29, Abr/1997.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A. Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

TIECCO, Gianfranco. **Microbiologia degli alimenti di origine animale**. 5 ed. Bologna: Edagricole, p. 51 – 87, 1992.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M. J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADES, J. R.; LASA, I. The enterococcal surface protein, *Esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4538–4545, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 195-203, 2012.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002. Method 1600: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using Membrane-*Enterococcus* Indoxyl-B-D-Glucoside Agar (mEI). Office of Water. U.S. **Environmental Protection Agency**, Washington, DC.

VIANA, Eliseth de Souza. **Moléculas sinalizadoras de *Quorum Sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrotóficas isoladas de leite**. 2006. 176 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview – Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125-148, 1994.

APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

Os resultados desta pesquisa estão apresentados em 2 artigos científicos.

Artigo 1 – *Enterococcus* sp. ISOLADOS DO PROCESSAMENTO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS SUÍNOS E SENSIBILIDADE CELULAR AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL

Artigo 2 - PERFIL DE RESISTÊNCIA A AGENTES SANITIZANTES DE BIOFILMES FORMADOS POR ISOLADOS DE *Enterococcus* sp.

ARTIGO 1***Enterococcus* sp. ISOLADOS DO PROCESSAMENTO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS
SUÍNOS E SENSIBILIDADE CELULAR AOS DESINFETANTES DE USO
INDUSTRIAL**

MÜCKE, N.¹; MAIA, L. F.^{2*}

1 - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR–PR – Campus Medianeira

2 - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR–PR – Campus Londrina

* autor correspondência: lucianamaia@utfpr.edu.br

RESUMO

MÜCKE, N.; MAIA, L. F. 2016. *Enterococcus* sp. Isolados do Processamento de Embutidos Cárneos Suínos e Sensibilidade Celular aos Desinfetantes de uso Industrial.

Enterococos pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas e são amplamente distribuídos na natureza. Constituem uma grande proporção das bactérias da microbiota do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos, aves, répteis e insetos. Sua maior importância está relacionada ao fato de serem considerados patógenos oportunistas, provocando uma infinidade de doenças. Na sanitização, removem-se os microrganismos até níveis aceitáveis pela legislação. A redução do número de microrganismos é fundamental em plantas produtoras de alimentos, onde superfícies úmidas favorecem o crescimento destes. Este estudo teve por finalidade realizar o isolamento de *Enterococcus* de equipamentos das linhas de processos de embutidos cárneos cozidos e de iogurtes, identificar por meio de técnicas moleculares as espécies dos isolados, verificar a suscetibilidade biocida a sete formulações de diferentes desinfetantes de uso industrial. Nas amostras coletadas na linha de iogurtes não houve o crescimento de colônias indicativas. Das 36 amostras coletadas nas linhas de produção de embutidos cárneos cozidos, selecionou-se 40 colônias que ao submeter à avaliação genotípica, obtivemos que 70,0% (28 isolados) possuíam o gene *tuf* que identifica o gênero *Enterococcus* sp. Identificamos que 7,1% pertenciam aos gêneros *E. faecium*, 7,1% *E. gallinarum* e 7,1% *E. casseliflavus/E. flavencens*. 78,7 % dos isolados não foram identificados ao nível de espécie com os oligonucleotídeos utilizados neste estudo. Ao avaliar a ação de sanitizantes sobre células de *Enterococcus* sp. na presença de água apresentaram menor desenvolvimento na presença do produto espumante alcalino clorado A nos tempos 15 minutos, 3 horas e 24 horas, ácido peracético nos tempos 30 minutos e 1 hora e amônia quaternária D no tempo 2 e 3 horas. Observou-se que nenhum produto utilizado conseguiu ser totalmente eficiente no controle do desenvolvimento dos enterococos em presença de água. Nos testes utilizando BHI e sanitizante os isolados apresentaram menor desenvolvimento na presença do sanitizante amônia quaternária D em todos os tempos, sendo que nos tempos 15 minutos, 1, 2, 3 e 24 horas não houve desenvolvimento. O maior desenvolvimento ocorreu na presença dos produtos dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e ácido peracético em todos os tempos, sendo que para os dois primeiros produtos todos os isolados foram resistentes em todos os tempos. Os resultados desta pesquisa devem ser utilizados como alerta para ressaltar a importância de ações preventivas nas indústrias, como validações dos processos de higienização, rotatividade entre os produtos químicos para evitar a resistência dos microrganismos a determinados compostos e avaliação do local (composição dos resíduos, tempo disponível para higienização e sanitização, composição dos equipamentos e/ ou estruturas) para maximizar a eficiência dos procedimentos aplicados.

Palavras chave: Enterococos. Produtos Químicos. Desenvolvimento.

ABSTRACT

MÜCKE, N.; MAIA, L. F. 2016. *Enterococcus* sp. isolated from the embedded processing and swine meat cell sensitivity to disinfectants for industrial use.

Enterococci belong to the group of lactic acid bacteria and are widely distributed in nature. They constitute a large proportion of the gastrointestinal tract microbiota of most mammals, birds, reptiles and insects. Its importance is related to the fact that they are considered opportunistic pathogens, causing diverse diseases. In sanitation, the microorganisms are removed to acceptable levels by the legislation. Reducing the number of microorganisms is essential in food industry plants, which wet surfaces favoring the growth thereof. This study aimed to carry out the isolation of the genus *Enterococcus* strains of equipment of pork cooked sausages and yogurts lines, identified through molecular techniques the species isolated and check the biocide susceptibility of seven formulations of different industrial disinfectants. On the yogurts line samples analyzed there was no growth of indicative colonies. Of the 36 swabs performed in the sausage line, 40 colonies were selected to undergo genotypic evaluation, showed that 70.0% (28 isolates) had the *tuf* gene that identifies the genus *Enterococcus* sp. It was verified that 7.1% belonged to the genus *E. faecium*, 7.1% *E. gallinarum*, 7.1% *E. casseliflavus/E. flavescens* and 78.7% of the isolates were not identified to species level using the oligonucleotides used in this study. The sanitizing action on cells of *Enterococcus* sp. grow in the presence of water, was lower in the presence of alkaline chlorinated foaming at times 15 minutes, 3 hours and 24 hours; peracetic acid at times 30 minutes to 1 hour; and quaternary ammonium D at time 2 and 3 hours. No product could be used effectively on enterococci control of grow in the presence of water. In tests using BHI and sanitizing the isolates were less developed in the presence of quaternary ammonia D sanitizer at all times, and in the time 15 minutes, 1, 2, 3 and 24 hours there was no development. Further development occurred in the presence of chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid at all times, and for the first two products all isolates were resistant at all times. These results should be used as a warning to highlight the importance of preventive actions in industries such as validation of cleaning processes, turnover among chemicals to avoid resistance of microorganisms to certain compounds and place assessment (waste composition, time available for cleaning and sanitizing, breakdown of equipment and/or facilities) to maximize efficiency of the procedures applied.

Keywords: Enterococci. Chemicals compounds. Development.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* é importante no ambiente, alimento e na microbiologia clínica. A função desta bactéria nos alimentos é controversa. Alguns autores afirmam que estes microrganismos apresentam benefícios como probióticos, além de desenvolver importante papel no processo de maturação e enriquecimento do sabor em alimentos fermentados, como queijos e embutidos (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; GIRAFFA, 2003).

Estes microrganismos podem apresentar-se isoladamente, aos pares ou em pequenas cadeias, sendo catalase negativos são anaeróbios facultativos e capazes de crescer em condições bastante variadas de temperatura (10° - 45 °C) e de pH (5,0 - 9,6) (FACKLAM et al., 1999). São capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares, geralmente toleram altas concentrações de NaCl (6,5%) (COLLINS et al., 1991; DEVRIESE et al., 1990; FACKLAM et al., 1989). O gênero compreende mais de 54 espécies, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as espécies prevalentes em alimentos (CHINGWARU et al., 2003; EUZÉBY, 2015; GIRAFFA, 2002).

Enterococos pertencem ao grupo das bactérias ácido láticas e são amplamente distribuídos na natureza, além de serem comensais do trato gastrointestinal de animais de sangue quente, sendo o mais abundante cocos Gram-positivo em humanos (FISHER; PHILLIPS, 2009; GIRAFFA, 2003; KLEIN, 2003). Portanto, sua presença em alimentos tem sido rejeitada por ser considerada contaminação de origem fecal.

Sua maior importância está relacionada ao fato de serem considerados patógenos oportunistas, provocando uma infinidade de doenças. Este fato está intimamente relacionado aos seus fatores de virulência e resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, comumente utilizados no tratamento de cocos Gram-positivos, além de adquirir facilmente marcadores genéticos via processo conjugativo (FISHER; PHILLIPS, 2009). Ainda, muitos isolados apresentam a capacidade aminobiogênica, podendo acumular nos alimentos, e são consideradas uma ameaça para a saúde humana (LADERO et al., 2010).

Os detergentes, embora diminuam a carga bacteriana das superfícies, tem como função principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais, enquanto a sanitização visa à redução dos microrganismos deteriorantes e a eliminação dos patogênicos a níveis seguros (FORSHYTE, 2013; PENG et al., 2002).

Na sanitização, removem-se os microrganismos até níveis aceitáveis pela legislação, podendo ser realizada tanto por métodos físicos (calor, radiação), quanto por métodos

químicos (compostos clorados, iodados, ácidos orgânicos, entre outros). A redução do número de microrganismos é fundamental em plantas de alimentos, onde superfícies úmidas favorecem o crescimento destes (MASSAGUER, 2005). Podemos destacar entre os principais sanitizantes utilizados na indústria de alimentos o ácido peracético, cloraminas orgânicas, clorexidina, compostos de amônia quaternária, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, iodóforos e o peróxido de hidrogênio (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

Diversos estudos apontam que *Enterococcus* sp. são resistentes a diversos tipos de agentes químicos, porém muitos utilizados na área da saúde, a exemplo hidróxido de cálcio (SHARIFIAN et al., 2008), fenol e clorexidina (DAVID et al., 2014), hidróxido de cálcio (BARBOSA et al., 1987), hipoclorito de sódio a 0,25 e 0,12% (SOUZA et al., 1992). Poucos são os estudos que abordam a resistência de enterococos a desinfetantes utilizados na indústria de alimentos.

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo realizar o isolamento de cepas do gênero *Enterococcus* de equipamentos das linhas de processos de embutidos cárneos cozidos e de iogurtes, proceder a identificar molecular ao nível de gênero-espécie e verificar a susceptibilidade biocida a sete formulações de diferentes desinfetantes de uso industrial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO DE *Enterococcus* sp.

O isolamento de *Enterococcus* sp. realizou-se com o auxílio de *swab* a partir de equipamentos envolvidos no processamento de iogurtes e embutidos cárneos cozidos.

Para a linha de processo de embutidos a coleta das amostras realizou-se no início, meio e fim de produção em dois dias distintos (considerando o início logo após a sanitização antes do início do processo). Na linha de produção de iogurtes foi realizado no período da noite em dois dias distintos (devido fluxo contínuo de produção os equipamentos são higienizados em etapas, selecionou-se equipamentos após a higiene e no final de produção), em janeiro de 2014.

A amostra compreendeu cinco partes distintas dos equipamentos das linhas de produção, previamente selecionadas com base na área de contato das matérias-primas nos

equipamentos (Figura 1). Para a linha de iogurtes os equipamentos selecionados foram: bicos de envase (total de 5), esteiras de produtos, tubulação de resfriamento de produto (entrada e saída do trocador de calor), fermenteiras (total de 4), tubulações da bomba positiva de envase. Para a linha de embutidos: moedores (total de 2), tanque de PVC, carrinho de inox, embutideiras (total de 3), misturadeiras (total de 2) e silo de cura de massa. Foram coletadas, no total, 36 amostras na linha de embutidos e 24 na linha de iogurtes.

O *swab* foi realizado em zig zag em diversos sentidos totalizando 100 cm², utilizando um molde de inox esterilizado 20x20 cm². O palito foi depositado em 3 mL de água peptonada 0,1% (v/v) seguido de incubação a 37 °C por 18 h. Posteriormente, uma alçada foi semeada na superfície de ágar canamicina esculina azida (KEA-Issofar), com incubação a 37 °C por 24 h. Colônias indicativas de *Enterococcus* spp. (cor negra) foram repicadas em meio ágar infusão cérebro e coração (BHI-Himedia), seguida de incubação para análises posteriores.

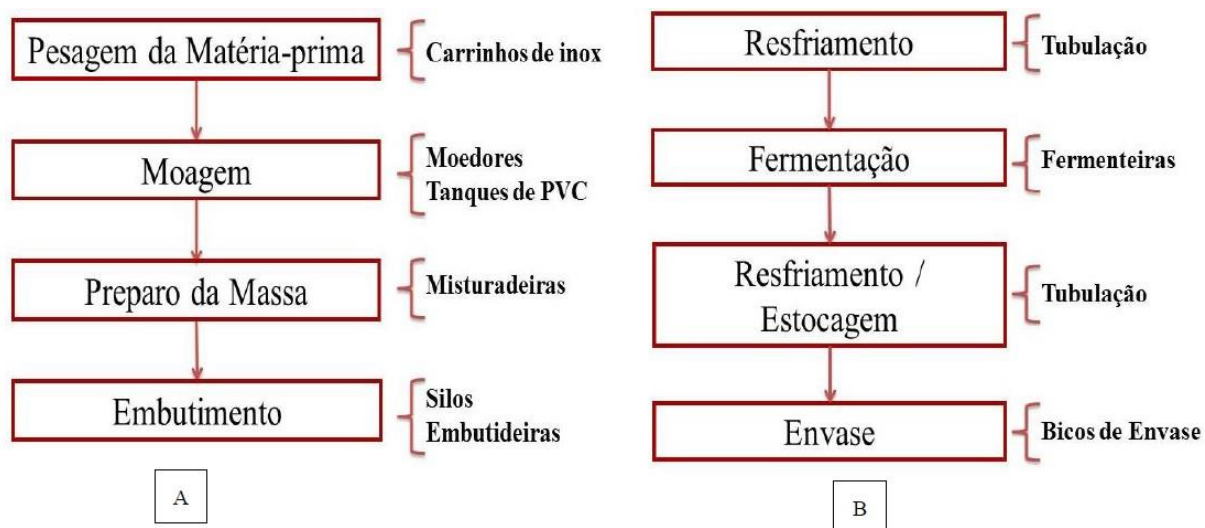


Figura 1 – Fragmentos dos fluxogramas das linhas de produção de embutidos cárneos cozidos (A) e produção de iogurte (B) com identificação dos pontos de coleta com o *swab*.

Fonte: Autor (verificação *in loco*)

2.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE GÊNERO/ESPÉCIE

Para identificação fenotípica ao nível de gênero, as amostras bacterianas foram submetidas aos testes fisiológicos convencionais: método de Gram, produção da catalase,

crescimento bacteriano a 10 °C e 40 °C e em 6,5% de NaCl, segundo metodologia descrita por Facklam et al. (1999).

A extração de DNA total seguiu o método descrito por Marques e Suzart (2004), com modificações. Os isolados foram cultivados em 3 mL de caldo BHI, incubados sob agitação de 180 rpm, a 37 °C por 18 h. Após o crescimento, 1 mL de cada cultivo foi centrifugado por 10 min a 10.000 rpm. O sedimento foi ressuspendido em 300 µL de água ultrapura esterilizada. A suspensão de células foi aquecida a 100 °C por 30 minutos e posteriormente, submetida a um choque térmico em banho de gelo por 5 minutos e novamente centrifugada. Um volume de 150 µL do sobrenadante foi removido e armazenado em freezer a -20 °C.

Os isolados foram identificados ao nível de gênero/espécie pela reação de PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores espécie-específico para *Enterococcus* sp.

Gene	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Ta (°C)	Tamanho do produto (bp)	Referências
<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGAG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	56	112	KE et al. (1999)
<i>vanC-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	56	822	
<i>vanC-2</i> , <i>vanC-3</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	56	439	Dutka-Malen et al. (1995)
<i>ddl_{E.faecalis}</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	56	941	
<i>ddl_{E.faecium}</i>	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	56	550	

Legenda: Ta (°C), temperatura de anelamento; gene *tuf*, *Enterococcus* sp.; *vanC-1*, *E. gallinarum*; *vanC-2*, *vanC-3*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*.

As reações foram realizadas em termociclador (Techne-TC3000), em volume final de 20 µL, contendo 10 µL DNA (10ng/µL), 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 20 µmol de cada oligonucleotídeo iniciador (forward e o reverse), 2,5U Taq DNA polimerase (Invitrogen).

O termociclador foi programado para realizar desnaturação á 94 °C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1

minuto, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. O controle negativo não continha amostras de DNA. Os produtos resultantes da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação computadorizado (Loccus). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de 1KB DNA plus (Amersham Pharmacia Biotech).

2.3 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS SANITIZANTES

Os isolados confirmados foram submetidos ao teste de suscetibilidade biocida. Para tanto, sete formulações de diferentes compostos químicos foram utilizadas, segundo as recomendações de uso pelo fabricante (Tabela 2). A ação biocida foi avaliada em duas diferentes condições, sendo na presença de matéria orgânica, utilizando meio BHI e na presença de água.

Os isolados foram semeados em ágar Mueller-Hinton (MH) e incubados a 37 °C por 18 h. Uma porção da colônia foi selecionada e transferida para tubos contendo água estéril até turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (1×10^8 UFC/ml). Os testes foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato. Para tanto, um volume de 200 µL de água ou BHI e com a cultura de *Enterococcus* foram acrescentado em cada poço da placa e em seguida acrescido às soluções de sanitizantes conforme concentrações de trabalho. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. O desenvolvimento microbiano foi avaliado por densidade óptica (DO) nos tempos 0, 15 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 3 h e 24 h. Controle negativo foi o meio sem a presença da bactéria.

Para calcular a concentração inibitória mínima, a leitura da DO foi normalizada. Para a normalização, a DO mensurada no tempo zero de cada poço, foi denotado como DO *background*, e subtraído das leituras posteriores. Se houve diferença na DO acima do *background*, este foi considerado positivo para crescimento bacteriano.

A fim de verificar a viabilidade celular, uma alíquota de 10 µL foi retirada de cada poço em cada tempo e depositada na superfície de ágar KEA. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 h.

Tabela 2 – Princípio ativo, concentração indicada pelo fabricante e concentração utilizada dos desinfetantes utilizados nos testes de estabilidade biocida de *Enterococcus* sp.

Princípio Ativo	Concentração Indicada pelo Fabricante	Concentração Utilizada
Espumante alcalino clorado H	2,0%	20 µl/mL
Amônia Quaternária D	10,0 %	100 µl/mL
Dióxido de Cloro	100 ppm	1 µl/mL
Hipoclorito de sódio	5 ppm	0,05 µl/mL
Amônia Quaternária M	1,5 %	15 µl/mL
Ácido Peracético	0,30 %	3 µl/mL
Espumante alcalino clorado A	3,0 %	30 µl/mL

Fonte: Deion; Mundial Química; AEB Group; Higex; 2013.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus* sp. NA LINHA DE PRODUÇÃO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS COZIDOS

Foram coletadas um total de 36 amostras na linha de produção de embutidos cárneos cozidos, sendo selecionadas 40 colônias de cor negra no ágar KEA, que indica a hidrólise da esculina na presença de bile por espécies de *Enterococcus* spp. Nas amostras coletadas na linha de iogurtes não houve o crescimento de colônias indicativas deste microrganismo. As colônias selecionadas que apresentaram características fenotípicas de *Enterococcus* sp., foram submetidas à identificação molecular. Como resultado obtivemos que 70,0% (28 isolados) possuíam o gene *tuf* que identifica o gênero *Enterococcus* sp., cujo tamanho do amplicon foi de 112 pares de base (pb). Destes, 7,1% das colônias isoladas correspondiam à espécie *E. faecium*, 7,1% *E. gallinarum* e 7,1% *E. casseliflavus*/*E. flavencens*, utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos. Setenta e oito por cento dos isolados somente foram identificados ao nível de gênero neste estudo (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação dos enterococos isolados a partir dos swabs realizados na linha de produção de embutidos cárneos cozidos através do PCR

Isolado	Equipamento	Identificação	Isolado	Equipamento	Espécie
1	Embutideira 2	<i>Enterococcus</i> spp.	19	Moedor	<i>Enterococcus</i> spp.
2	Embutideira 2	<i>Enterococcus</i> spp.	21	Carrinho inox	<i>Enterococcus</i> spp.
3	Embutideira 2	<i>Enterococcus</i> spp.	22	Silos	<i>E. faecium</i>
4	Embutideira 2	<i>Enterococcus</i> spp.	23	Silos	<i>E. casseliflavus/E. flavencens</i>
5	Moedor	<i>Enterococcus</i> spp.	24	Silos	<i>E. casseliflavus/E. flavencens</i>
6	Misturadeira	<i>Enterococcus</i> spp.	25	Embutideira 10	<i>Enterococcus</i> spp.
7	Embutideira 5	<i>Enterococcus</i> spp.	26	Embutideira 10	<i>Enterococcus</i> spp.
8	Embutideira 5	<i>Enterococcus</i> spp.	27	Embutideira 10	<i>E. gallinarum</i>
9	Embutideira 5	<i>Enterococcus</i> spp.	29	Moedor	<i>Enterococcus</i> spp.
10	Embutideira 5	<i>Enterococcus</i> spp.	30	Moedor	<i>Enterococcus</i> spp.
11	Embutideira 5	<i>E. faecium</i>	33	Moedor	<i>Enterococcus</i> spp.
16	Tanque PVC	<i>Enterococcus</i> spp.	38	Embutideira 10	<i>Enterococcus</i> spp.
17	Moedor	<i>Enterococcus</i> spp.	39	Embutideira 10	<i>E. gallinarum</i>
18	Moedor	<i>Enterococcus</i> spp.	40	Moedor	<i>Enterococcus</i> spp.

O isolamento de enterococos ficou distribuído em diversos equipamentos durante o processo de produção de embutidos cárneos suínos cozidos, antes do processo de cocção. A maior concentração de isolamento se deu na embutideira seguida do moedor (Figura 2). Nas embutideiras e moedores são os locais onde há maior contato com variadas matérias-primas (suína, de aves e bovina) e ingredientes, o que pode explicar o alto número de isolados obtidos nestes equipamentos se destacando dos demais.

A capacidade que *Enterococcus* tem de se adaptar às condições adversas, como altas e baixas temperaturas, e concentrações elevadas de sal, possibilita seu desenvolvimento em vários tipos de alimentos.

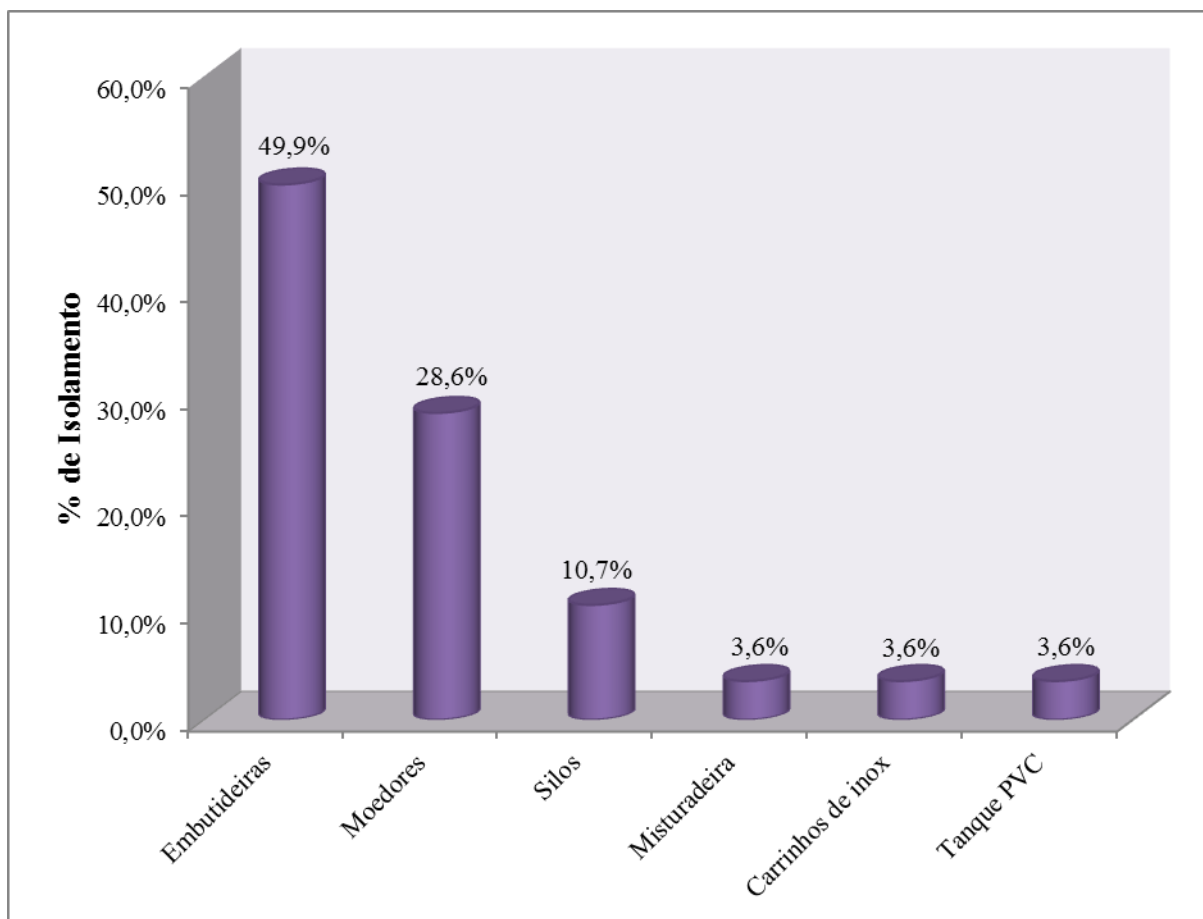


Figura 2 - Percentual de isolamento de enterococos nos equipamentos utilizados na linha de produção de embutidos.

Em nossos resultados não obtivemos o isolamento de *E. faecalis*; resultados semelhantes foram obtidos por Campos (2013) analisando carne suína, por Gomes et al. (2008) em alimentos constituídos de leite cru e pasteurizado, produtos de carne, queijos e legumes, por Fracalanza et al. (2007) em carne de aves e leite pasteurizado e por Klibi et al. (2013) em carnes cruas.

Fracalanza et al. (2007) e Klibi et al. (2013) também relataram a presença de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* em alimentos, corroborando com nossos resultados.

Gomes et al. (2008) analisaram amostras de gêneros alimentícios, constituídos de leite cru e pasteurizado, produtos de carne, queijos e legumes, e detectaram que 52,5% das amostras foram positivas para o gênero *Enterococcus* sp.

Embora a maior concentração de isolamento de enterococos tenha ocorrido em equipamentos relacionados a processos anteriores ao da cocção, vale ressaltar que enterococos

podem resistir ao processamento térmico. Aslam et al. (2012) isolaram *E. faecalis* em amostras de carcaça crua, após pasteurização e produto final.

Carvalho et al. (2005) isolaram *Enterococcus* sp. em queijo após processamento térmico, indicando sua resistência à altas temperaturas.

3.2 – AÇÃO BIOCIDA DE SANITIZANTES SOB CÉLULAS DE *Enterococcus* sp.

Neste estudo, observamos a ação de sanitizantes sobre células de *Enterococcus* sp. na presença de água e BHI, nos tempos 0, 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3 e 24 h de exposição (Tabela 4). A eficiência biocida sobre as células foi realizada pela mensuração da DO, onde o valor da DO mensurada no tempo 0 (T0) foi subtraída da DO mensurada nos demais tempos. DO acima da DO do tempo T0 foi considerado positivo para crescimento bacteriano.

Para os testes utilizando água e sanitizante, os isolados apresentaram menor desenvolvimento na presença do produto espumante alcalino clorado A nos tempos 15 minutos, 3 h e 24 h, ácido peracético nos tempos 30 minutos e 1 h e amônia quaternária D no tempo 2 h. Observou-se que nenhum produto utilizado conseguiu ser totalmente eficiente no controle do desenvolvimento dos enterococos em presença de água.

Nos testes utilizando BHI e sanitizante os isolados apresentaram menor desenvolvimento na presença do sanitizante amônia quaternária D em todos os tempos, sendo que nos tempos 15 minutos, 1, 2, 3 e 24 h não houve desenvolvimento. O maior desenvolvimento ocorreu na presença dos produtos dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e ácido peracético em todos os tempos, sendo que para os dois primeiros produtos todos os isolados foram resistentes em todos os tempos.

Podemos observar que a ação dos sanitizantes foi comprometida com a presença de matéria orgânica (BHI). Ainda, o tempo de exposição não foi o ponto relevante para a ação dos mesmos, uma vez que apenas amônia quaternária D e espumante alcalino clorado A (em água) e amônia quaternária D (em BHI) reduziram consideravelmente o desenvolvimento celular nas primeiras 3 h de contato. Contudo, com exceção á amônia quaternária D em BHI, houve desenvolvimento celular na presença de todos os sanitizantes após 24 h de contato. Podemos sugerir algumas hipóteses, como a perda da atividade biocida ou o desenvolvimento de células resistentes.

Tabela 4 – Percentual de desenvolvimento celular dos isolados de enterococos em água e BHI contendo sanitizantes

Tempo	Espumante alcalino clorado H		Amônia Quaternária D		Dióxido de Cloro		Hipoclorito de sódio		Amônia quaternária M		Ácido peracético		Espumante alcalino clorado A	
	Água	BHI	Água	BHI	Água	BHI	Água	BHI	Água	BHI	Água	BHI	Água	BHI
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
15 minutos	75%	29%	64%	0%	93%	100%	50%	100%	78%	89%	78%	96%	25%	43%
30 minutos	82%	29%	75%	3,5%	86%	100%	46%	100%	89%	86%	18%	100%	54%	36%
1 hora	79%	50%	61%	0%	71%	100%	61%	100%	78%	93%	21%	100%	32%	93%
2 horas	64%	71%	43%	0%	89%	100%	50%	100%	78%	100%	89%	100%	43%	100%
3 horas	50%	71%	14%	0%	86%	100%	78%	100%	89%	100%	86%	100%	21%	100%
24 horas	71%	96%	100%	0%	100%	100%	78%	100%	100%	96%	78%	100%	71%	100%

O isolamento de enterococos foi realizado em diversos turnos de atividades, sendo: início de produção, meio e fim de produção. Após o fim do turno é o momento onde se realiza a sanitização dos equipamentos. Nossos resultados apresentaram que 75% dos isolados foram obtidos no período correspondente ao meio dos turnos de produção, 21,4% fim de produção e 3,6% início de produção. Este resultado evidenciou que mesmo após o processo de higienização e sanitização aplicado na indústria foi possível isolar *Enterococcus* sp. dos equipamentos.

Em nosso estudo, utilizamos o meio BHI para simular a presença de matéria orgânica, pois vários autores atribuem a ineficiência dos sanitizantes à matéria-orgânica restante nas superfícies. Beltrame et al. (2012) afirma que o efeito dos sanitizantes pode ser alterado em função das características da superfície, temperatura e tempo de contato, concentração do produto, pH, propriedades físico-químicas da água e especialmente à presença de matéria orgânica. A perda da atividade na presença de matéria orgânica também é descrita nas pesquisas de Gelinat e Goulet (1983) e McDonnell e Russel (1999), variando com o princípio ativo e microrganismo alvo, demonstrando a importância de validações para escolha de produtos a serem utilizados em programas de higiene.

Os compostos de amônia quaternária são detergentes catiônicos sintéticos que possuem atividade antimicrobiana (PELCZAR et al., 1980). Eficiente em baixas concentrações frente a bactérias, bolores, leveduras e vírus (FRASIER, 1993). Sua ação bactericida é atribuída à inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, à desnaturação de proteínas celulares e à ruptura da membrana celular (ROMÃO, 1996).

Moura et al. (2011) atestaram que o uso de amônia quaternária a 0,26% acrescido de leite em pó reconstituído foi eficiente no controle de *Enterococcus* após 15 minutos de contato. Entretanto, Sander et al. (2002) ao confrontar 17 amostras de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia* e *Pasteurella*, provenientes de avicultura, verificaram que a amônia quaternária foi incapaz de promover inativação das amostras.

Existem várias teorias sobre o mecanismo da atividade antimicrobiana do ácido peracético (BALDRY e FRASE, 1988; DAVIS et al., 1980; FRASER, 1987; PAVLOVA e KULIKOVSKII, 1978). Camargo (2011) agrupa a destruição de células bacterianas pelo ácido peracético em 3 diferentes mecanismos: a desnaturação de proteínas da célula e interrupção do transporte celular, a inativação de enzimas essenciais para o metabolismo da célula e a ruptura das membranas celulares e quebra da sua permeabilidade. Ainda, apresenta excelente

ação sanitizante contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras, vírus e esporos, permanecendo ativo em presença de matéria orgânica e não é afetado pela dureza da água (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

Colla et al. (2014) ao avaliar a eficácia de três sanitizantes (clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético com tempos de contato de um, cinco, dez e quinze minutos, e adicionados de 1 ml de leite ultrapasteurizado) frente a isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças de suínos verificou que o sanitizante mais efetivo foi o ácido peracético a 0,5% por 15 minutos. Em estudo realizado por Briñez et al. (2006) foi mensurado o efeito bactericida de ácido peracético utilizando leite esterilizado semidesnatado, suco de laranja, ovo líquido e leite com chocolate, adicionados como substâncias interferentes contra isolados patogênicos e não patogênicos de *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. e *Escherichia coli*, verificou-se que o mesmo foi efetivo em concentrações de 0,1 % e 10 minutos de exposição em todos os casos.

Beltrame et al. (2012) avaliou a eficiência de quatro sanitizantes (ácido peracético, clorexidina, amônia quaternária e ácidos orgânicos) na presença de leite reconstituído, utilizando diferentes bactérias: *Salmonella* sp., *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. Como resultado, verificou que o ácido peracético apresentou maior eficiência em tempos de contato de 2 minutos. Contrários a estes autores, nossos resultados indicam que os isolados de enterococos foram resistentes ao ácido peracético, inclusive na presença de BHI, em todos os tempos testados.

A fim de verificar a capacidade de sobrevivência celular na presença de sanitizantes, a cada tempo de contato, retiramos uma alíquota da cultura e semeamos em meio KEA. Observamos o desenvolvimento característico de colônias de *Enterococcus* sp., quando na presença dos produtos espumante alcalino clorado H, amônia quaternária D, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, amônia quaternária M e ácido peracético. Em contrapartida, não houve crescimento quando na presença do sanitizante amônia quaternária D (com BHI), corroborando com os dados obtidos pela DO.

A utilização em larga escala de hipoclorito de sódio está relacionada ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus, além do fato de ser um produto relativamente barato, de rápida ação, efetivo em baixas concentrações além de ser de fácil aplicação (EMMANUEL et al., 2004). Nas indústrias de alimentos é utilizado no processo de desinfecção de tubulações, equipamentos e ambientes (MACÊDO e JORDÃO, 1999). Quando em solução aquosa, o hipoclorito de sódio origina o ácido hipocloroso, um ácido fraco que em valores de pH inferiores a 6,0 encontra-se em sua forma não dissociada,

sendo este o principal responsável pela ação antimicrobiana (TROLLER, 1993). O ácido hipocloroso tem a capacidade de atravessar a membrana celular, oxidar os grupos sulfidrilas de certas enzimas que participam da via glicolítica, e, desta forma, eliminar a célula. O hipoclorito de sódio perde eficiência quando reage com a matéria orgânica e deve ser armazenado de maneira adequada, pois o contato da luz decompõe os produtos clorados e a temperatura elevada provoca sua volatilização (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

Ayhan et al. (1999), testaram duas concentrações de hipoclorito de sódio (0,5% e 5,25%), sobre microrganismos comumente encontrados em sistemas de canais radiculares, entre eles *E. faecalis*, utilizando discos de papel Whatman de 6 mm de diâmetro embebido com a solução de teste sobre placas de Petri ágar previamente semeadas e verificaram que a maior concentração resultou em diminuição significativa no crescimento da bactéria. Negreiros et al. (2014) identificou isolados de *E. faecalis* tolerantes as concentrações de 2,5% e 8,5% de hipoclorito de sódio (sem presença de matéria-orgânica). No presente estudo observou-se que o hipoclorito em presença de água conseguiu diminuir o crescimento microbiano, porém em solução com BHI foi totalmente ineficiente, assim como o dióxido de cloro.

Fraise (2002) explica que os possíveis mecanismos de tolerância a biocidas em cocos Gram-positivos incluem bombas de efluxo, alteração do sítio alvo e mudanças na estrutura da parede celular. Para Cânoa (2008) uma das desvantagens da utilização do cloro é que este biocida é rapidamente inativado pela matéria orgânica, tendo escassa atividade quando aplicado a superfícies de carcaças e de equipamentos sujos por resíduos durante o processo. Segundo Sander et al. (2002), bactérias apresentam tolerância após uma exposição prolongada aos desinfetantes, e bactérias do mesmo gênero e espécie podem apresentar diferenças na sensibilidade frente ao mesmo desinfetante.

A ação dos sanitizantes é afetada pelo tipo e concentração de microrganismos contaminantes, características da superfície, tempo e temperatura de contato, concentração de uso, tipos de resíduos presentes na superfície, pH, propriedades físico-químicas da água e por substâncias inativadoras (ANDRADE et al., 2008).

Ainda são escassos os trabalhos abordando a temática da resistência bacteriana a sanitizantes de uso industrial. Nosso estudo foi pioneiro na análise da sensibilidade de *Enterococcus* sp., provenientes da linha de produção de embutidos cárneos, frente a 7 sanitizantes de uso industrial.

4 CONCLUSÃO

Para os testes utilizando água e sanitizante, os isolados de *Enterococcus* sp., provenientes do ambiente de produção de embutidos cárneos cozidos, apresentaram menor desenvolvimento na presença do produto espumante alcalino clorado nos tempos 15 minutos, 3 h e 24 h, ácido peracético nos tempos 30 minutos e 1 h e amônia quaternária D no tempo 2 h. Observa-se que nenhum produto utilizado conseguiu ser totalmente eficiente no controle do desenvolvimento dos enterococos em presença de água. Nos testes utilizando BHI e sanitizante os isolados apresentaram menor desenvolvimento na presença do sanitizante amônia quaternária D em todos os tempos, sendo que nos tempos 15 minutos, 1, 2, 3 e 24 h não houve desenvolvimento. O maior desenvolvimento ocorreu na presença dos produtos dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e ácido peracético em todos os tempos, sendo que para os dois primeiros produtos todos os isolados foram resistentes em todos os tempos. Os resultados desta pesquisa devem ser utilizados como alerta para ressaltar a importância de ações preventivas nas indústrias, como validações dos processos de higienização, rotatividade entre os produtos químicos para evitar a resistência dos microrganismos a determinados compostos e avaliação do local (composição dos resíduos, tempo disponível para higienização e sanitização, composição dos equipamentos e/ ou estruturas) para maximizar a eficiência dos procedimentos aplicados.

REFERÊNCIAS

AEB, Group. Disponível em: <<http://www.aeb-group.com/or4/or?uid=aeb.main.index&oid=188207>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2008, 410 p.

ASLAM, M.; DIARRA, M. S.; MASSON, L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genotypes of *Enterococcus faecalis* recovered from a proking processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 10, p. 1486-1491, 2012.

AYHAN, H.; SULTAN, N.; CIRAK, M.; RUHI, M. Z; BODUR, H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **International Endodontic Journal**, v. 32, p. 99-102, 1999.

BALDRY, M. G. C.; FRASER, J. A. L. **Disinfection with peroxygens**. In industrial Biocides, edited by K. R. Payne, Wiley, N.Y, p. 91-116, 1988.

BELTRAME, C. A.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A.; ROTTAVA, I.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, R.; CANSIAN, R. L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 228-233, abr.-jun. 2012.

BARBOSA, S. V.; ALMEIDA, D. HCT 20 - uma solução irrigadora para canais radiculares humanos. Análise in vitro. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 44, n. 5, p. 21- 28, set./out. 1987.

BRIÑEZ, W. J.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; HERRERO, M. H.; LÓPEZ-PEDEMONTE & GUAMIS, B. Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 17, p. 516-521, 2006.

CAMARGO, Liliane Rodrigues. **Formação de biofilmes microbianos em membranas poliméricas de poliamida e polietersulfona e seu controle por agentes sanitizantes**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2011.

CAMPOS, Thais de. **Resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados de carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2013.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanais comercializados em Fortaleza - CE. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, 2005.

CÂNNOA, Jorge Miguel Horta. **Requisitos para a implantação do HACCP em matadouros de aves**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

CHINGWARU, W.; MPUCHANE, S. F.; GASHE, B. A. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 931-936, 2003.

COLLA, F. L.; MION, L.; PARIZOTTO, L.; SANTOS, L. A.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e eficácia de sanitizantes frente aos isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças suínas no Rio Grande do Sul. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 320-324, abril 2014.

COLLINS, M. D.; RODRIGUES, U. M.; PIGOTT, N. E.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus dispar* sp. Nov. a new *Enterococcus* species from human sources. **Letters in Applied Microbiology**, v. 12, p. 95 -98, 1991.

DAVID, O. M.; FAKAYODE, I. B.; FAMUREWA, O. Evaluation of the anti-enterococcal activity of disinfectants and medicated soaps on vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains. **Annual Research and Review in Biology**; v. 4, n. 3, p. 509-519; 2014.

DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. **In Microbiology Including Human and Molecular Genetics**, 3 ed. Harper and Row Publishers, Inc., London, p. 344-351, 1980.

DEION, Indústria e Comércio de Detergentes Ltda. Disponível em: <<http://www.deiondetergentes.com.br/index.htm>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

DEVRIESE, L. A.; CEYSSENS, K.; RODRIGUES, U. M.; COLLINS, M. D. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. **FEMS Microbiology Letters**, v. 71, p. 247-252, 1990.

DUTKA-MALEN. S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.

EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfestation using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Enviroment International**, v. 30, p. 891-900, 2004.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnames.html>>. Acesso em: 15 out. 2015.

FACKLAM, R. R.; SAHM, M. D.; TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: Murray, B. E.; Baron, E. J.; P. FALLER, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Yolken, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7^a ed. American Society for Microbiology Press. Washington DC, EUA, p. 297-305, 1999.

FACKLAM, R. R. & COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 731-734, 1989.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749-1757, 2009.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança de Alimentos**, 2^a ed., Porto Alegre: Artmed, 2013, 602 p.

FOUQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1-24, 2006.

FRACALANZZA, S. A. P.; SCHEIDEGGER, E. M. D.; SANTOS, P. F.; LEITE, P. C.; TEIXEIRA, L. M.. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 853-859, 2007.

FRASER, J. A. L. Novel applications of peracetic acid in industrial disinfection. **Specialty Chemicals**, n. 7, p. 178-186, 1987.

FRAISE, A. P. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 31, p. 158S-162S, 2002.

FRASIER, William C. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed. Acribia, Zaragoza. 1993, 681 p.

GELINAS, P.; GOULET, J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. **Journal of Applied Microbiology**, v. 54, p. 243-247, 1983.

GIRAFFA, Giorgio. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 215-222, 2003.

GIRAFFA, Giorgio. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

HIGEX, Smart cleaning. Disponível em: <<http://www.higex.com.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

KE, D.; PICARD, F. J.; MARTINEAU, F.; MÉNARD, P. H. R.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3497-3503, 1999.

KLEIN, Günter. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 123-131, 2003.

KLIBI, N.; SAID, L. B.; JOUINI, A.; SLAMA, K. B.; LÓPEZ, M.; SALLEM, R. B.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 675-680, 2013.

LADERO, V.; CALLES-ENRIQUEZ, M.; FERNANDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 2, p. 145-156, 2010.

MACÊDO, T. C. S.; JORDÃO, C. P. Formação de Trihalometanos em soluções sanificantes utilizadas no processo de desinfecção de indústrias de alimentação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 309, p. 216-230, 1999.

MARQUES, E. B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 53, p. 1069-1073, 2004.

MASSAGUER, Pilar Rodriguez de. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, p. 191-205, 2005.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MOURA, A. C. de; SANTOS, A. M. dos; PINTO, F. G. da S.; PEREIRA, K. K. Perfil de resistência microbiana aos principais sanitizantes utilizados em frigoríficos da cidade de Cascavel no Paraná. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo-SP, v. 25, n. 202/203, p. 170-175, nov./dez. 2011.

MUNDIAL QUÍMICA. Disponível em: < <http://mundialquimica.com.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

NEGREIROS, M. O.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G. Estudo in vitro da ação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 8, n. 2, p. 41-50, 2014.

PAVLOVA, I. B.; KULOKOVSKII, A. V. Submicroscopic study of bacteria, spores under effect of peracetic acid and some aspects of the mechanism of action of the preparation. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, n. 1, p. 37-41, 1978.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. v. 1. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, 1980, 566 p.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 11-18, 2002.

ROMÃO, Célia M. C. A. Desinfecção e esterilização química, p. 133-162. In: Teixeira, Pedro. (Ed.), **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Fiocruz, Rio de Janeiro, 1996.

SHARIFIAN, M. R.; SHOKOUHINEJAD, N.; ALIGHOLI, M.; EMANEINI, M.; KATEBI, A.; ASSADIAN, H. In vitro comparison of the effectiveness of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations on *Enterococcus faecalis*. **Iran Endod J.**, v. 3, n. 3, p. 50-56, 2008.

SANDER, J. E.; HOFACRE, C. L.; CHENG, I-H.; WYATT, R. D. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. **Avian Disiases**, Washington, v. 46, p. 997-100, 2002.

SOUZA, M. M.; SOUZA, M. C. M. G.; SAQUY, P. C. Ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e tempos de contato. **Revista Odonto**, v. 2, n. 4, p. 302-306, 1992.

TROLLER, J. A. **Sanitation in Food Processing**. 2 ed. Academic Press, 1993. 456 p.

ARTIGO 2**PERFIL DE RESISTÊNCIA A AGENTES SANITIZANTES DE BIOFILMES
FORMADOS POR ISOLADOS DE *Enterococcus* sp.**

MÜCKE, N.¹; MAIA, L. F.^{2*}

1 - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR–PR – Campus Medianeira

2 - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR–PR – Campus Londrina

* autor correspondência: lucianamaia@utfpr.edu.br

RESUMO

MÜCKE, N.; MAIA, L. F. 2016. Perfil de resistência a agentes sanitizantes de biofilmes formados por isolados de *Enterococcus* sp.

Enterococos são bactérias comensais que colonizam o trato digestório de uma ampla gama de hospedeiros vertebrados e, portanto, difundida no meio ambiente. Os biofilmes microbianos são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de EPS, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores de alimentos, podendo comprometer a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados. O presente trabalho teve por objetivo verificar a ação de sete formulações de diferentes compostos químicos, segundo as recomendações de uso pelo fabricante, sobre a formação de biofilme, no biofilme formado e biofilme desidratado de *Enterococcus* sp. Independente do tipo de sanitizantes e biofilme formado, nenhum agente químico foi eficaz na eliminação total do biofilme de *Enterococcus*. Notou-se que os menores desenvolvimentos para biofilme foram obtidos na presença do produto amônia quaternária D nos tempos 10 minutos e 1 hora, ácido peracético no tempo 15 minutos e amônia quaternária M no tempo 30 minutos. Para o biofilme desidratado os menores resultados foram observados no teste utilizando amônia quaternária M no tempo 10 minutos e 15 minutos, amônia quaternária D nos tempos 30 minutos e 1 hora. Verificou-se que os biofilmes formaram-se mesmo sobre as superfícies sanitizadas, mesmo que tenham sido utilizados as concentrações e tempo médios recomendados pelos fabricantes. Observou-se que os menores valores de formação de biofilme foram obtidos utilizando os espumantes alcalinos clorados H e amônia quaternária D e M, com resultados similares entre os isolados independentes da espécie. É fundamental ressaltar que todos os isolados foram resistentes a todos os produtos químicos. Os procedimentos de higienização e sanitização nas indústrias contemplam diversas etapas, que visam aumentar a eficiência dos processos e ação dos produtos químicos. Os resultados desta pesquisa demonstram o quão importante é a implementação de programas de higiene dentro das indústrias a fim de evitar a resistência dos microrganismos e biofilmes por eles formados, a determinados compostos e conseqüente contaminação dos produtos e/ou outras superfícies.

Palavras chave: Enterococos. Desinfetantes. Desenvolvimento.

ABSTRACT

MÜCKE, N.; MAIA, L. F. 2016. Resistance profile of the agents sanitizers of biofilms formed for isolates of *Enterococcus* sp.

Enterococci are commensal bacteria that colonize the digestive tract of a wide variety of vertebrate hosts, and therefore widespread in the environment. Microbial biofilms are formed by sessile communities cells, mono or multi adhered to a substrate, embedded in an EPS matrix, whose formation microorganisms exhibit distinct phenotypes, metabolism, physiology and gene transcription. Once established, biofilms act as points of constant contamination, releasing cells of pathogenic and/or spoilage of food microorganisms, which could compromise the microbiological quality of raw materials, pre-finished and finished products. This aim of this work was to verify the action of seven formulations of different chemical compounds, according to recommended use by the manufacturer on the formation of biofilm, the biofilm and biofilm dehydrated of *Enterococcus* sp. Independent of the type of sanitizers and biofilm formed, no chemical agent was effective in complete elimination of biofilms of *Enterococcus*. It is noted that lower results were obtained for biofilm in the presence of the product quaternary ammonium D at times 10 minutes and 1 hour, peracetic acid at time 15 minutes and quaternary ammonium M at time 30 minutes. For biofilm dehydrated the worst results were observed using quaternary ammonium M at time 10 minutes and 15 minutes, quaternary ammonium D at times 30 minutes and 1 hour. Note that biofilms were formed even on the sanitized surfaces following the average concentration-time recommended by the manufacturer. It is observed that the lower results of biofilm development were obtained using chlorinated alkaline foaming H and quaternary ammonium D and M, with similar results among independent isolates of the species. It is important to emphasize that all isolates were resistant to all chemicals. Cleaning and sanitizing procedures in industries include several steps aimed at increasing the efficiency of processes and action of chemicals. The results demonstrate how important is the implementation of hygiene programs within the industry to avoid the resistance of microorganisms and biofilms formed by them, to certain compounds and consequent contamination of the products and/or other surfaces.

Keywords: Enterococci. Disinfectants. Development.

1 INTRODUÇÃO

Os enterococos são cocos Gram-positivos, que fazem parte da microbiota intestinal dos seres humanos e animais, e tem sido comumente isolado de alimentos e água (CASSENEGO et al., 2011; RIBOLDI et al., 2009). O gênero *Enterococcus* sp. tem a capacidade de sobreviver às condições ambientais adversas, tais como temperaturas extremas (10-45°C), os valores de pH (4,5-10,0) e salinidade (FISHER; PHILLIPS, 2009). Estas características podem contribuir para a disseminação e persistência dos enterococos em uma notável variedade de ambientes (FISHER; PHILLIPS, 2009).

Nos alimentos, enterococos desenvolvem importante papel como culturas iniciadoras ou como probióticos, no entanto, não são considerados como GRAs (“generally recognized as safe”), devido à sua utilização como um indicador de contaminação fecal (CASSENEGO et al., 2011).

Biofilmes microbianos são comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de EPS, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002). Na indústria de alimentos, os biofilmes são uma fonte potencial de contaminação do produto e pode levar à deterioração dos alimentos e graves problemas de contaminação em equipamentos (FISHER; PHILLIPS, 2009).

Vários elementos exercem influência no processo de adesão e formação de biofilmes bacterianos, como hidrofobicidade, carga da superfície, temperatura, presença de substrato, aparatos celulares como pili, fímbrias e flagelos, diferenças existentes entre as superfícies utilizadas no processamento de alimentos e a configuração dos equipamentos em relação à facilidade ou não de limpeza e sanitização (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

O EPS é constituído essencialmente por polissacáridos, ADN, proteínas, e células mortas, restringindo a penetração de agentes antimicrobianos, incluindo sanitizantes (BRANDA et al., 2005; PATTERSON, 2009).

Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores de alimentos, podendo comprometer a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados (BERESFORD; ANDREW; SHAMA, 2001; CHEN et al., 2007; FUSTER-VALLS et al., 2008; MANSFELD, 2007).

Após a formação do biofilme, os microrganismos que se encontram em seu interior são protegidos da remoção quando expostos ao escoamento de líquidos, alta turbulência e à ação de agentes químicos como os utilizados nos procedimentos de higienização (CLONTZ, 2008).

Outra problemática envolvendo a formação de biofilme na indústria de alimentos é a capacidade das células sésseis serem resistentes aos agentes empregados nos procedimentos de higienização, sendo que as células sésseis são mais resistentes que as células planctônicas (DRENKARD, 2003).

Diversos estudos mostram que isolados de *E. faecium*, *E. faecalis* apresentam resistência a diferentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos (CASTRO, 2012; JESSEN; LAMMERT, 2003).

O presente trabalho teve por objetivo verificar a ação de sete formulações de diferentes compostos químicos, segundo as recomendações de uso pelo fabricante, sobre a formação de biofilme, no biofilme formado e biofilme desidratado de *Enterococcus* sp.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo, foram analisados 22 isolados de *Enterococcus* spp., 2 *E. faecium*, 2 *E. gallinarum*, 2 *E. casseliflavus*/*E. flavencens*, provenientes de amostras da linha de processamento de embutidos cárneos suínos (Tabela 1). Os isolados estavam conservados em glicerol em freezer -80°C. Estes isolados pertencem a bacterioteca particular da professora Dra. Luciana Furlaneto Maia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina.

Para a reativação, foi retirada uma alíquota de 20 µL de cada isolado, inoculada em caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubada por 24 h a 37 °C. Após a turvação do meio, realizou-se um inóculo em ágar BHI e este foi utilizado para a realização dos testes.

Tabela 1 – Isolados de enterococos da linha de produção de embutidos cárneos cozidos

Isolado	Espécie	Isolado	Espécie
1	<i>Enterococcus</i> spp.	19	<i>Enterococcus</i> spp.
2	<i>Enterococcus</i> spp.	21	<i>Enterococcus</i> spp.
3	<i>Enterococcus</i> spp.	22	<i>E. faecium</i>
4	<i>Enterococcus</i> spp.	23	<i>E. casseliflavus/E. flavencens</i>
5	<i>Enterococcus</i> spp.	24	<i>E. casseliflavus/E. flavencens</i>
6	<i>Enterococcus</i> spp.	25	<i>Enterococcus</i> spp.
7	<i>Enterococcus</i> spp.	26	<i>Enterococcus</i> spp.
8	<i>Enterococcus</i> spp.	27	<i>E. gallinarum</i>
9	<i>Enterococcus</i> spp.	29	<i>Enterococcus</i> spp.
10	<i>Enterococcus</i> spp.	30	<i>Enterococcus</i> spp.
11	<i>E. faecium</i>	33	<i>Enterococcus</i> spp.
16	<i>Enterococcus</i> spp.	38	<i>Enterococcus</i> spp.
17	<i>Enterococcus</i> spp.	39	<i>E. gallinarum</i>
18	<i>Enterococcus</i> spp.	40	<i>Enterococcus</i> spp.

2.2 AÇÃO DE SANITIZANTE EM BIOFILME DE *Enterococcus* sp.

2.2.1 Ação do sanitizante em biofilme

A formação do biofilme em superfície de poliestireno foi realizada de acordo com metodologia descrita por Stepanovic et al. (2000). Os isolados de enterococos foram cultivados a 37 °C por 24 h em meio BHI. A densidade celular foi ajustada até turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/ml), e uma alíquota de 200 µL de cada suspensão foi transferida para placas de 96 poços de fundo chato. O controle negativo foi o inóculo de caldo sem a presença da bactéria. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, o meio de cultura e células planctônicas foram removidos das placas e os poços lavados com água destilada estéril por três vezes.

Em seguida, foi adicionado o sanitizante nas concentrações descritas na Tabela 2. Nos tempos 5, 10, 15, 30, e 60 min o sanitizante foi removido e os poços lavados com água destilada estéril por três vezes. A viabilidade celular foi observada utilizando uma solução de 0,5 mg/ml de XTT [2,3-bis(2-methyloxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide].

A mensuração da eficiência sobre as células foi realizada pela mensuração da DO de 490 nm usando um leitor de microplaca (ELx808™ Absorbance Microplate Reader-BioTek), onde o valor da DO mensurada no tempo 0 (T0) foi subtraída da DO nos demais tempos. DO acima da DO do tempo T0 foi considerado positivo para crescimento bacteriano.

Tabela 2 – Princípio ativo, concentração indicada pelo fabricante e concentração utilizada dos desinfetantes utilizados nos testes de ação sobre biofilme de *Enterococcus* sp.

Princípio Ativo	Concentração Indicada pelo Fabricante	Concentração Utilizada
Espumante alcalino clorado H	2,0%	20 µl/mL
Amônia Quaternária D	10,0 %	100 µl/mL
Dióxido de Cloro	100 ppm	1 µl/mL
Hipoclorito de sódio	5 ppm	0,05 µl/mL
Amônia Quaternária M	1,5 %	15 µl/mL
Ácido Peracético	0,30 %	3 µl/mL
Espumante alcalino clorado A	3,0 %	30 µl/mL

Fonte: Deion; Mundial Química; AEB Group; Higex; 2013.

2.2.2 Ação dos sanitizantes em superfície de biofilme desidratado

Para este ensaio, a formação do biofilme seguiu conforme descrito no anterior. Após a primeira lavagem para remoção do meio e células planctônicas, as placas de 96 poços foram mantidas em fluxo laminar com circulação de ar, por um período de 4 h ou até secagem completa. Na sequência foi adicionado o sanitizante e seguiu-se o protocolo descrito anteriormente.

2.2.3 Ação do sanitizante na formação de biofilme

A ação do sanitizante como inibidor da formação do biofilme também foi avaliado. O procedimento seguiu como descrito anteriormente, contudo, antes do inóculo bacteriano, os poços foram tratados com a solução sanitizante por um período de 5 minutos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS DE *Enterococcus*

Todos os isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme (Figura 1), em superfície de poliestireno, seguindo os critérios descritos por Stepanovic et al. (2000). Para tanto, consideramos que:

$DO_A \leq DO_C$ - Considerada não formadora de biofilme (NF)

$DO_C < DO_A \leq 2 DO_C$ - Fracamente formadora de biofilme (FRF)

$2DO_C < DO_A < 4DO_C$ - Moderadamente formadora de biofilme (MF)

$DO_A \geq 4DO_C$ - Fortemente formadora de biofilme (FF)

DO_C =densidade óptica do controle.

DO_A = densidade óptica da amostra.

Observamos que 32% dos isolados foram fracamente, 47% moderadamente e 21% fortemente formadores de biofilme.

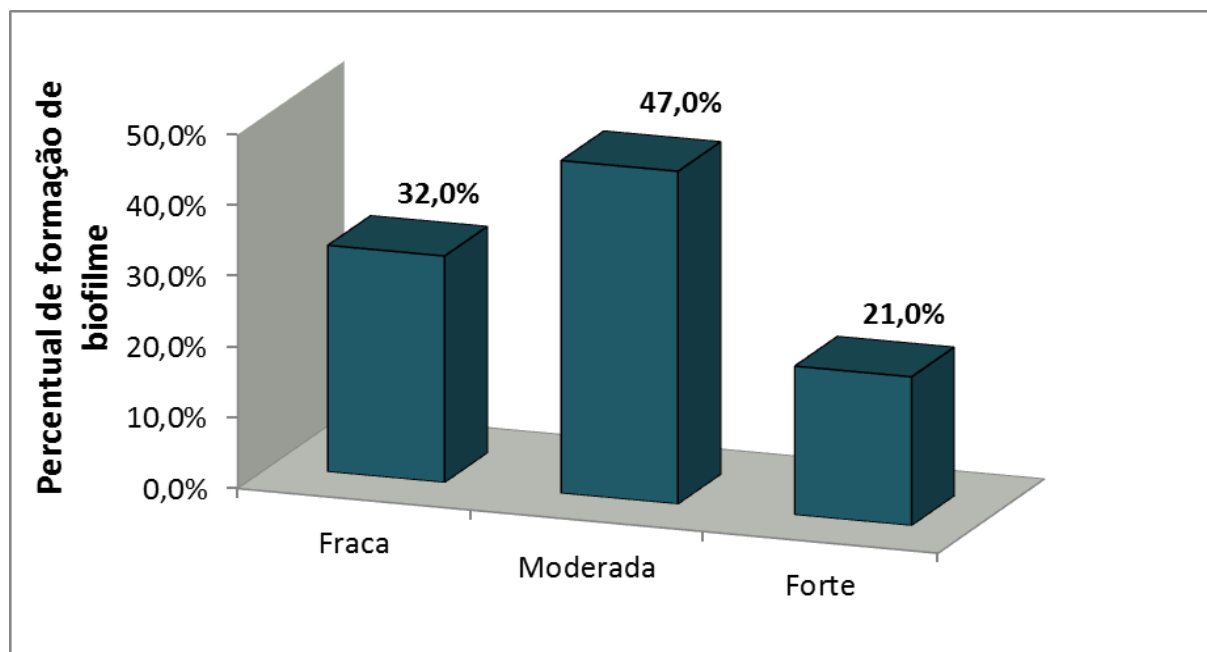


Figura 1. Percentual de isolados de *Enterococcus* sp. que apresentaram diferentes intensidades na formação de biofilme.

3.2 AÇÃO DE SANITIZANTE EM BIOFILME E BIOFILME DESIDRATADO

Neste estudo, observamos a ação de sanitizantes sobre biofilme e biofilme desidratado de *Enterococcus* sp. (Tabela 3) nos tempos 0, 10, 15, 30 e 60 minutos de exposição.

Para esta avaliação, foi mensurada a capacidade da célula em reduzir o composto XTT, mostrando assim a viabilidade celular. Nota-se que os menores resultados para biofilme formado foram obtidos na presença do produto amônia quaternária D nos tempos 10 minutos e 1 h, ácido peracético no tempo 15 minutos e amônia quaternária M no tempo 30 minutos.

No biofilme desidratado os menores desenvolvimentos foram observados no teste utilizando amônia quaternária M no tempo 10 minutos e 15 minutos, amônia quaternária D nos tempos 30 minutos e 1 h.

Os resultados mostram que células de biofilme desidratadas apresentaram mais resistência aos sanitizantes espumante alcalino clorado H e ácido peracético, quando comparados com biofilme formado.

Já para os demais sanitizantes, os valores de sobrevivência/resistência dependem do tempo de exposição e condição de formação do biofilme. Contudo, observamos que

independente do tipo de sanitizantes e biofilme formado, nenhum agente químico foi eficaz na eliminação total do biofilme de *Enterococcus*.

O ácido peracético é considerado um dos mais efetivos no combate a biofilmes bacterianos e sua alta eficiência tem sido atribuída a grande capacidade de oxidação do material celular (MARQUES et al., 2007; ROSSONI; GAYLARDE, 2000). Porém nesta pesquisa o ácido peracético foi o mais eficiente apenas no tempo 15 min para o biofilme formado.

Corroborando com nosso estudo, Castro et al. (2012) relataram a resistência de *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, em biofilmes mono e multi-cultura em superfície de aço inoxidável AISI 304, ao hipoclorito de sódio, ácido peracético e digluconato de clorexidina. Oviedo (1996) também observou maior eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio e amônia quaternária na redução de biofilme formado por *E. faecium*, em comparação ao ácido peracético e clorexidina.

Tabela 3 – Percentual de células viáveis no biofilme e biofilme desidratado após ação dos sanitizantes

Tempo	Espumante alcalino clorado H		Amônia Quaternária D		Dióxido de Cloro		Hipoclorito de sódio		Amônia Quaternária M		Ácido peracético		Espumante alcalino clorado A	
	Biofilme	Desid.	Biofilme	Desid.	Biofilme	Desid.	Biofilme	Desid.	Biofilme	Desid.	Biofilme	Desid.	Biofilme	Desid.
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
10 minutos	43%	71%	36%	54%	50%	75%	50%	54%	50%	50%	50%	75%	54%	61%
15 minutos	54%	79%	64%	75%	64%	57%	68%	61%	57%	57%	50%	64%	61%	57%
30 minutos	61%	79%	46%	43%	68%	57%	71%	64%	43%	50%	57%	76%	64%	68%
1 hora	54%	64%	50%	39%	54%	61%	82%	86%	75%	50%	75%	86%	86%	75%

Nota: Desid.: biofilme desidratado.

Nesta pesquisa o hipoclorito não foi o mais efetivo em nenhum tempo e condição utilizada, embora o cloro atue na remoção de matéria orgânica especialmente proteínas além de suas propriedades desinfetantes (AARNISALO et al., 2007).

Ziech (2015) ao avaliar a tolerância de biofilme maduro formado em polipropileno e poliuretano, à sanitizantes comumente utilizados na indústria (detergente alcalino clorado, ácido peracético e ambos combinados), obteve os melhores resultados de inativação de *Salmonella* sp. na forma de biofilme com o uso de detergente alcalino clorado. Nesta pesquisa os biofilmes de enterococos apresentaram uma diminuição no desenvolvimento em relação ao tempo 0, na presença do espumante alcalino clorado H e espumante alcalino clorado A, entretanto em nenhum tempo e condição o produto foi totalmente eficiente.

Jessen e Lammert (2003) afirmam que a remoção de microrganismos de superfícies de contato torna-se muito mais difícil após a formação do biofilme, e geralmente este procedimento só será possível pela adoção de várias ações combinadas, como a utilização de mais de um sanitizante. Hood e Zottola (1997) afirmam que comparar resultados de estudos de eficiência de sanitizantes é complexo devido à variação nas condições para a aderência e desenvolvimento do biofilme, podendo interferir na ação do agente sanitizante. Variáveis como as características microtopográficas das superfícies, rugosidade, presença de fissuras ou fendas podem diminuir a eficiência do processo de higienização e interferir diretamente nos resultados obtidos (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam a necessidade de vastas avaliações e validações pelas indústrias a fim de estabelecer o melhor procedimento de higiene, assim como o melhor sanitizante e/ou a combinação deles e as concentrações para possibilitar a eliminação/redução dos biofilmes.

3.3 AÇÃO DO SANITIZANTE SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME

Neste estudo, observamos a ação de sanitizantes sobre a formação de biofilme de *Enterococcus* sp. (Tabela 4) após 5 minutos de exposição. A mensuração da eficiência sobre as células foi realizada pela mensuração da DO no tempo de 5 minutos.

Tabela 4 – Resultados de densidade óptica dos biofilmes formados após 5 minutos de tratamento da superfície com os sanitizantes

Isolados	Espécie	Espumante alcalino clorado H	Amônia Quaternária D	Dióxido de Cloro	Hipoclorito de sódio	Amônia quaternária M	Ácido peracético	Espumante alcalino clorado A
1	<i>E. spp.</i>	0,071	0,061	0,244	0,315	0,045	0,110	0,200
2	<i>E. spp.</i>	0,042	0,119	0,264	0,355	0,189	0,302	0,461
3	<i>E. spp.</i>	0,048	0,062	1,310	0,226	0,227	0,394	0,510
4	<i>E. spp.</i>	0,053	0,081	1,857	0,461	0,121	0,507	0,593
5	<i>E. spp.</i>	0,042	0,053	2,494	1,402	0,043	0,169	0,606
6	<i>E. spp.</i>	0,041	0,058	3,047	0,614	0,049	0,168	1,028
7	<i>E. spp.</i>	0,042	0,051	1,315	0,308	0,047	0,947	0,568
8	<i>E. spp.</i>	0,049	0,057	1,875	0,763	0,048	0,319	0,820
9	<i>E. spp.</i>	0,039	0,045	2,933	0,584	0,041	0,122	1,384
10	<i>E. spp.</i>	0,039	0,052	2,851	0,618	0,044	0,161	0,517
11	<i>E. f</i>	0,042	0,050	1,254	0,405	0,049	0,236	0,742
16	<i>E. spp.</i>	0,045	0,054	1,552	0,412	0,049	0,388	0,879
17	<i>E. spp.</i>	0,042	0,047	2,933	0,361	0,040	0,207	1,009
18	<i>E. spp.</i>	0,043	0,045	2,151	0,658	0,043	0,279	0,842
19	<i>E. spp.</i>	0,041	0,052	3,335	0,464	0,044	0,347	1,545
21	<i>E. spp.</i>	0,042	0,052	1,810	0,443	0,044	0,375	1,982
22	<i>E. f</i>	0,047	0,045	2,726	0,372	0,041	0,452	1,187
23	<i>E. cf</i>	0,042	0,042	4,280	0,602	0,044	0,148	1,431
24	<i>E. cf</i>	0,041	0,050	3,997	0,482	0,046	0,715	0,772
25	<i>E. spp.</i>	0,044	0,045	2,189	0,327	0,049	0,299	1,954
26	<i>E. spp.</i>	0,042	0,047	2,660	0,261	0,041	0,429	1,380
27	<i>E. g</i>	0,040	0,046	2,818	0,551	0,047	0,128	1,129
29	<i>E. spp.</i>	0,042	0,049	1,829	0,707	0,046	0,158	0,723
30	<i>E. spp.</i>	0,044	0,052	2,238	0,511	0,047	0,182	0,919
33	<i>E. spp.</i>	0,036	0,042	2,758	0,577	0,041	0,321	1,100
38	<i>E. spp.</i>	0,040	0,043	1,929	0,736	0,044	0,152	0,966
39	<i>E. g</i>	0,042	0,056	2,227	0,558	0,047	0,299	0,577
40	<i>E. spp.</i>	0,043	0,050	1,411	0,434	0,047	0,443	0,871

Nota: *E. spp.*, *Enterococcus spp.*; *E. f.*, *Enterococcus faecium*; *E. cf.*, *E. casseliflavus/E. flavencens*; *E. g.*, *E. gallinarum*.

Este tempo (5 min) é requerido pela maioria dos fabricantes de sanitizantes, como sendo o tempo ideal para promover a limpeza do local. Contudo, observados biofilmes formados sobre as superfícies sanitizadas, mesmo após a utilização de concentrações e tempo médios recomendados. Observou-se que os menores valores de formação de biofilme foram obtidos utilizando os espumantes alcalinos clorados H e amônia quaternária D e M, com resultados similares entre os isolados independentes da espécie. É fundamental ressaltar que todos os isolados foram resistentes a todos os produtos químicos.

O maior desenvolvimento de biofilme foi evidenciado na presença do sanitizante dióxido de cloro, porém este produto possui alta volatilização e em contato com a luz decompõe os produtos clorados (USEPA, 1999; WHO, 2002), o que pode explicar os resultados encontrados.

Ao final da produção nas indústrias alimentícias os equipamentos e utensílios apresentam elevada carga de resíduos como consequência da presença de carboidratos, gordura, proteína e minerais, que se tornam substrato para o crescimento de microrganismos contaminantes, e devem ser rapidamente removidos (ANDRADE; MACÊDO, 1996). A maior ou menor habilidade que as culturas microbianas têm em se aderir às superfícies está diretamente relacionada ao tipo de substrato (SHI & ZHU, 2009).

Os procedimentos de higienização consistem no uso combinado de detergentes e/ou ação física e/ou sanitizantes, no qual os detergentes e ação física tem como função principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais, enquanto a sanitização visa à redução dos microrganismos deteriorantes e eliminação dos patogênicos a níveis seguros (MORAES, 1997).

Estas etapas são fundamentais, pois o processo de remoção dos biofilmes é extremamente difícil, as indústrias sempre devem adotar avaliações frequentes da condição dos equipamentos e utensílios com o auxílio de *swabs* exploratórios e avaliações da eficiência dos procedimentos de higiene pré-operacional e operacional (CLONTZ, 2008). Segundo Gram et al. (2007), embora não esteja ainda completamente comprovado, acredita-se que com a utilização incorreta dos produtos de limpeza e desinfecção, determinadas espécies de microrganismos podem se adaptar, ou mesmo promover a seleção daqueles que são tolerantes a alguns dos produtos usados.

Carandina (2013) ao avaliar a capacidade em formar biofilme de isolados *L. monocytogenes*, provenientes de ambiente de laticínios e caracterizar sua resistência a agentes sanitizantes, constataram que os isolados foram resistentes a ácido peracético, hipoclorito de sódio e tintura iodo, não resistiram à digluconato de clorexidina (composto de amônia

quaternária) e cloreto de benzalcônico. Colla et al. (2012) testaram amostras de *S. Heidelberg* frente à amônia quaternária e ácido peracético em dois anos distintos. O ácido peracético teve ação *in vitro* sobre as amostras isoladas em 2005 e 2009, enquanto que a clorexidina e a amônia quaternária tiveram sua ação reduzida frente às amostras de 2009, indicando a progressão da resistência bacteriana frente a estes sanitizantes.

Mello (1997) obteve redução de 6,4 e 5,5 ciclos log de *E. faecium* aderido em cupons de prova de aço inoxidável, quando expostos a ácido peracético e hipoclorito de sódio, respectivamente, após 10 minutos de contato. Fernandes et al. (2015) ao pesquisarem a eficácia de hipoclorito de sódio, ácido peracético, amônia quaternária e biguanida no controle de biofilmes mono e multiespécie de *E. faecalis*, *E. faecium*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, removeu os biofilmes em todas as condições de limpeza testadas, sendo o ácido peracético o sanitizante mais eficiente. Os autores ressaltam que a eficiência dos sanitizantes foi aumentada por um tratamento anterior com detergente, à ação do detergente foi necessária para a remoção desta matriz de nutrientes e EPS, facilitando a ação do detergente ácido e/ou sanitizantes na eliminação das células, sugerem etapas posteriores complementares, tais como a limpeza ácida e sanitização visando à redução dos microrganismos para níveis aceitáveis.

4 CONCLUSÃO

Os biofilmes formaram-se mesmo sobre as superfícies sanitizadas, mesmo que tenham sido utilizados as concentrações e tempo médios recomendados pelos fabricantes, independente da espécie. Todos os biofilmes foram resistentes a todos os produtos químicos. Os procedimentos de higienização e sanitização nas indústrias contemplam diversas etapas, dentre elas, recolha de resíduos, remoção de matéria orgânica com auxílio de água quente, dispersão de espuma através de equipamentos e ação física, enxague (com água quente) e sanitização. Estas etapas visam aumentar a eficiência dos processos e ação dos produtos químicos. Os resultados desta pesquisa demonstram o quanto importante é a implementação de programas de higiene dentro das indústrias a fim de evitar a resistência dos microrganismos e biofilmes por eles formados, a determinados compostos e conseqüente contaminação dos produtos e/ou outras superfícies.

REFERÊNCIAS

AEB, Group. Disponível em: <<http://www.aeb-group.com/or4/or?uid=aeb.main.index&oid=188207>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

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

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1996. 189 p.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. 2 ed. São Paulo (SP): Varela, 2008, 410 p.

BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 1000-1005, 2001.

BRANDA, S. S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20–26, 2005.

CARANDINA, Drucila Cristina Factor. **Avaliação de biofilmes formados por isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes**. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de São Paulo, Pirassununga-SP, 2013.

CASSENEGO, A. P. V.; D’AZEVEDO, P. A.; RIBEIRO, A. M. L.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S. T.; FRAZZON, A. P. G. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 480-488, 2011.

CASTRO, Marcília Santos Rosado. ***Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. isolados de ambiente de processamento de produtos lácteos: identificação, formação de biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes**. 2012. 225 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D. M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, p. 249-254, 2007.

CLONTZ, Lucia. A contaminação microbiana pode causar uma redução de fluxo e corrosão das linhas do sistema de água. **Revista Controle de Contaminação**, n. 109, 2008.

COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; DICKEL, E. L.; BORSOI, A.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p.289-292, 2012.

DEION, Indústria e Comércio de Detergentes Ltda. Disponível em: <<http://www.deiondetergentes.com.br/index.htm>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DRENKARD, Eliana. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 3, p. 1213-1219, 2003.

DUTKA-MALEN. S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.

FERNANDES, M. S.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, S. Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 5-12, 2015.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749-1757, 2009.

FUSTER-VALLS, N.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 1165-1171, 2007.

HIGEX, Smart cleaning. Disponível em: <<http://www.higex.com.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145-153, 1997.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and Desinfection in Meat Processing Plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 265-269, 2003.

KE, D.; PICARD, F. J.; MARTINEAU, F.; MÉNARD, P. H. R.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3497-3503, 1999.

MANSFELD, Florian. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.

MARQUES, E. B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 53, p. 1069–1073, 2004.

MELLO, Cristiane de Albuquerque. **Avaliação da eficiência de sanificantes químicos em condições de uso simulado sobre psicrotróficos acidificantes**. 1997. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1997.

MORAES, M. S. V.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; PASSOS, F. J. V.; GOMIDE, L. A. M. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 17, n. 3, 1997.

MUNDIAL QUÍMICA. Disponível em: < <http://mundialquimica.com.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

OVIEDO, Maria Tereza Plata. **Resistência de psicrotróficos acidificantes isoaldos de leite cru a agentes sanificantes**. 1996. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1996.

PATTERSON, Pat. **CDC sterilization, disinfection guideline**. OR Manager. v. 25, n. 1, p. 14–16, 2009.

ROSADO, Marcília Santos. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: modelagem e controle por agentes sanitizantes**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2009.

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

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A. Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisores. Washington D. C: USEPA, **Office of Water**, 2009 (EPA 822-R-09-011).

VIANA, Eliseth de Souza. **Moléculas sinalizadoras de *Quorum Sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrófilas isoladas de leite**. 2006. 176 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chlorine dioxide (gas). Geneva: WHO, 2002. **Consise Internacional Chemical Assessment Document, 37**.

ZIECH, Rosangela Estel. **Caracterização de *Salmonella sp.* isolada de indústrias de aves baseada na formação de biofilmes, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Paraná, Palotina-PR, 2015.

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