

## Área: Engenharia de Alimentos

# AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE *Escherichia coli* EM TÁBUAS DE POLIETILENO USADAS NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

Cezar Augusto Beltrame, Marcela Geisa Becegatto, Cláudio Valério Junior, Ieda Rottava, Rogério Luis Cansian, Geciane Toniazzi, Jonaina Gomes, Jamile Zeni\*

Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências

Agrárias, URI-Campus de Erechim

\*E-mail: [jamilezeni@hotmail.com](mailto:jamilezeni@hotmail.com)

## RESUMO

O objetivo do estudo foi verificar a adesão bacteriana e formação de biofilmes em superfícies utilizadas no processamento de alimentos (tábuas de corte de polietileno), empregando *Escherichia coli*; e verificar a ação dos sanitizantes na remoção dos biofilmes. Foi observado um aumento da adesão de *E. coli* em função do tempo de contato para as superfícies avaliadas. O tratamento controle (0% de ácido peracético) apresentou crescimento linear até 24 horas e posterior estabilização na contagem até 72 horas de contato com a superfície. O aumento na concentração de sanitizante provoca uma redução linear no Log UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli*, a partir de 24 horas de contato da bactéria com a superfície. A concentração de 0,2% reduziu aproximadamente 3 ciclos logarítmicos até 24 horas de contato da bactéria com a superfície, e em média 2 ciclos a partir de 48 horas. A concentração de ácido peracético de 0,8%, a partir de 24 horas não foi capaz de sanitizar completamente a superfície, configurando, desta forma, a formação de biofilme. A partir de 48 horas de contato a uma concentração de 2,0%, o ácido peracético não se mostrou eficaz para eliminar todas as bactérias. Com base nestes resultados, pode-se concluir que o biofilme formado, reduz significativamente a ação do sanitizante.

**Palavras-chave:** Biofilmes, *Escherichia coli*, sanitizantes, remoção de biofilmes.

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana em superfícies de contato é uma grande preocupação para a indústria de alimentos, visto que sob condições favoráveis, as células bacterianas podem aderir às superfícies e reproduzirem-se. Se não forem completamente removidas, essas células

podem contribuir para a formação de uma complexa comunidade microbiana o que comprometerá a qualidade e segurança dos alimentos. A formação de biofilmes pode ocorrer em praticamente todas as superfícies envolvidas no processamento de alimentos (Morreli, 2008, Flach et al., 2005).

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

Os materiais das superfícies comumente usados no processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, polipropileno, policarbonato, aço-carbono, madeira, fibra de vidro, poliuretano, PVC, mármore, silicone, granito, teflon e vidro, permitem o crescimento microbiano, que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes, até mesmo quando programas de limpeza e sanitização são corretamente aplicados (Rodolfo Jr. et al., 2002; Lejeune, 2003). Deste modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície (Rossoni & Gaylarde, 2000).

O ácido peracético, também chamado de peróxido de ácido acético ou ácido peroxiacético é obtido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com o peróxido de hidrogênio. É um excelente sanitizante pela grande capacidade de oxidação dos componentes celulares dos micro-organismos, tendo uma rápida ação a baixas concentrações (0,0001% a 0,2%) sobre um amplo espectro de micro-organismos. É esporicida em baixas temperaturas e continua efetivo na presença de material orgânico sendo, portanto, um biocida efetivo sem residual tóxico. Sua ação biocida é influenciada pela concentração, temperatura e tipo de micro-organismos (Nascimento, 2002). O ácido peracético atua diretamente nas bases da molécula de DNA que são capazes de inativar a catalase, de uma enzima que pode interferir nos radicais hidroxil, podendo ocorrer uma desnaturação de proteínas e enzimas dos micro-organismos (Block, 1991).

O método de contagem padrão em placas baseia-se na premissa de que cada célula microbiana presente na amostra irá formar, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, uma colônia visível e isolada. Ao variar o tipo de meio de cultura e as condições de incubação é possível selecionar o gênero ou a espécie que se deseja contar. Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos, não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. A relação correta é feita entre o número de colônias e o número de unidades formadoras de colônias (UFC), que podem ser tanto individuais como agrupamentos característicos de certos micro-organismos (Silva et al., 1997).

Diante do exposto, é importante verificar a adesão bacteriana e formação de biofilmes em superfícies utilizadas no processamento de alimentos e verificar a ação dos sanitizantes na remoção dos biofilmes.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 2.1.1 Superfícies avaliadas

Para a avaliação da adesão bacteriana foram selecionadas superfícies comumente utilizadas nas indústrias de alimentos, tábuas de corte de Polietileno usadas.

#### 2.1.2 Micro-organismo, preparo das superfícies e prova de adesão

Para o estudo da adesão foi utilizada uma cultura de *Escherichia coli*. A preparação das superfícies para análise deu-se primeiramente pela limpeza por meio de escovação empregando-se água e detergente neutro líquido, enxágue com água destilada e posterior imersão em álcool etílico 70%, por 1 hora para remoção da gordura, novo enxágue foi realizado com água destilada e secagem ao ar. As superfícies serão expostas a luz ultravioleta (254nm), por 1 hora para sanitização (Parizzi, 1999).

As superfícies foram imersas, a temperatura ambiente, em frascos contendo 100 mL de caldo nutriente acrescido de um volume de suspensão de células bacterianas, de forma a obter-se uma contagem de  $10^3$ UFC/mL. Para isso, ativou-se a estirpe da bactéria em caldo nutriente e esta foi incubada a  $37^\circ\text{C}$ , por 24 horas por dois dias consecutivos, onde a contagem atingiu  $10^8$ UFC/mL. Para alcançar a contagem desejada, foi transferido 1mL dessa suspensão para um tubo contendo 9mL de água peptonada, alcançando-se a diluição  $10^7$ UFC/mL. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, de modo a se obter uma contagem de  $10^5$ UFC/mL. Posteriormente foi transferido 1mL desta para um erlenmeyer contendo 100mL de caldo nutriente, obtendo-se uma contagem de  $10^3$  UFC/mL, o qual foi confirmado por plaqueamento em Plate Count Agar (PCA). As superfícies devidamente esterilizadas (3 cubos para cada tempo) foram imersas nesse erlenmeyer com auxílio de uma pinça esterilizada e, então, incubados a  $37^\circ\text{C}$ . As avaliações da quantidade de células aderidas por centímetro quadrado foram realizadas durante 72 horas (0,1; 1; 3; 6; 12, 24; 36, 48 e 72h) de contato, em cada superfície. O tempo zero corresponde a análise realizada imediatamente após a imersão das superfícies no frasco contendo o meio de cultura e a suspensão bacteriana. As análises foram realizadas em triplicata.

### 2.1.3 Sanitização das superfícies após a adesão das bactérias

Concluído o período de incubação, as superfícies foram retiradas da suspensão de bactérias em caldo nutriente com auxílio de uma pinça esterilizada e imersas separadamente em 10mL de água peptonada a 0,1% por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersas em tubos contendo 5mL da mesma solução diluente e submetidas ao vórtex, durante 1 minuto para a remoção das células sésseis (Parizzi, 1999). Posteriormente estas foram submetidas a uma sanitização com ácido peracético em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 2%) e 10 minutos de exposição para verificar a eficiência destes frente aos biofilmes formados.

### 2.1.4 Contagem padrão em placas

A adesão bacteriana foi avaliada pela técnica da contagem padrão em placas (CPP), onde foi realizado swabs nas superfícies previamente sanitizadas. Diluições apropriadas foram

preparadas e transferidas para placas de Petri, nas quais foi adicionado o meio de crescimento PCA e incubou-se a 37°C, por 24 horas, procedendo-se em seguida a contagem. Os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 e Figura 1 apresentam dados referentes a adesão de *E. coli* em tábuas de corte de polietileno, já utilizadas na indústria de processamento de carnes. Os resultados mostram que o número de células aderidas aumentou com o tempo de contato para a superfície avaliada. O tratamento controle (0% de ácido peracético) apresentou crescimento linear até 24 horas e posterior estabilização na contagem até 72 horas de contato com a superfície. Como esperado, verifica-se que o aumento na concentração de sanitizante provoca uma redução linear ( $R^2 = 0,80$  a  $0,86$ ) no Log UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli*, a partir de 24 horas de contato da bactéria com a superfície. Analisando a Tabela 1, pode-se observar que a concentração de 0,2%, inferior a recomendada pelo fabricante, também mostrou-se capaz de reduzir aproximadamente 3 ciclos logarítmicos até 24 horas de contato da bactéria com a superfície, e em média 2 ciclos a partir de 48 horas. Considerando a concentração máxima de ácido peracético recomendada pelo fabricante (0,8%), a partir de 24 horas observa-se que o mesmo não foi capaz de sanitizar completamente a superfície, configurando, desta forma, a formação de biofilme. A partir de 48 horas de contato, mesmo com concentração 2,5 vezes superior a recomendada (2,0%), o ácido peracético não se mostrou eficaz para eliminar todas as bactérias. Com base nestes resultados, pode-se concluir que o biofilme formado, reduz significativamente a ação do sanitizante. Esses dados mostram a importância dos procedimentos de higienização nas superfícies que entram em contato com alimentos, pois se constatou que a formação de biofilmes pode ocorrer em um curto espaço de tempo, o que mostra a necessidade de se realizar uma boa higienização nas superfícies e equipamentos ao longo do processamento do alimento.

Tabela 1 - Número e Log de UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli* aderidas em polietileno durante 72h de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de ácido peracético (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%).

Concentração de ácido peracético	Tempo de contato						
	0,1h	1h	3h	6h	24h	48h	72h
0%	2,6x10 <sup>3</sup> (3,41)	1,9x10 <sup>4</sup> (4,28)	2,4x10 <sup>4</sup> (4,38)	5,2x10 <sup>5</sup> (5,72)	1,3x10 <sup>7</sup> (7,11)	1,6x10 <sup>7</sup> (7,20)	1,1x10 <sup>7</sup> (7,04)
0,2%	0	8,3x10 <sup>1</sup> (1,92)	1,5x10 <sup>2</sup> (2,18)	3,2x10 <sup>2</sup> (2,50)	2,9x10 <sup>4</sup> (4,46)	8,1x10 <sup>4</sup> (4,91)	1,1x10 <sup>5</sup> (5,04)
0,5%	0	0	1,7x10 <sup>1</sup> (1,23)	5,0x10 <sup>2</sup> (2,70)	2,5x10 <sup>3</sup> (3,40)	1,4x10 <sup>4</sup> (4,15)	2,6x10 <sup>4</sup> (4,42)
0,8%	0	0	0	0	3,3x10 <sup>1</sup> (1,52)	6,3x10 <sup>3</sup> (3,80)	1,7x10 <sup>4</sup> (4,23)
2,0%	0	0	0	0	0	3,5x10 <sup>1</sup> (1,54)	1,1x10 <sup>2</sup> (2,04)

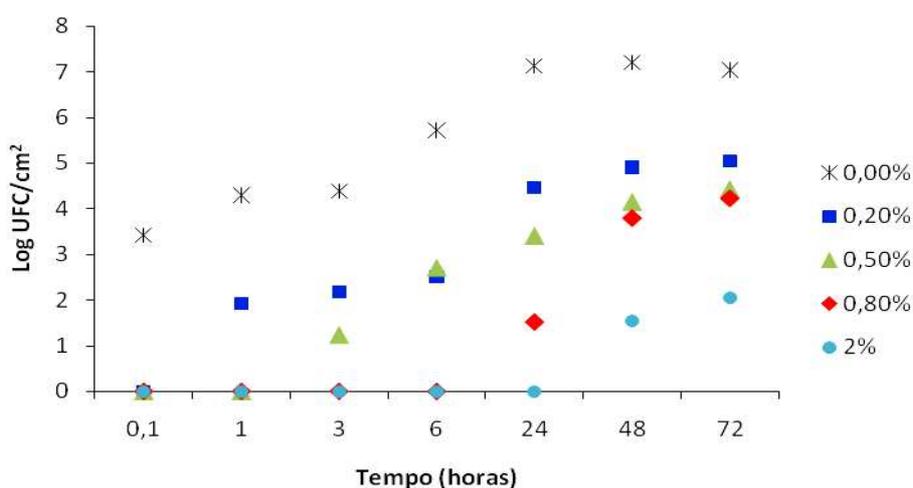


Figura 1 - Número e Log de UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli* aderidas em polietileno durante 72h de cultivo em caldo LB a 37°C, e em seguida sanitizadas com diferentes concentrações de ácido peracético (0; 0,2; 0,5; 0,8 e 2,0%).

Ronner e Wong (1993) consideraram como biofilme um número de  $10^3$  células aderidas por centímetro quadrado. Assim, segundo esses autores na superfície de PVC formou-se biofilme após um tempo de contato de 6 horas, enquanto para as superfícies de PVC observou-se a formação de biofilme em apenas 4 horas de tempo de contato. Wirtanen et al. (1996) e Andrade et al. (1998) afirmaram ser necessária uma população de células de  $10^5$  e  $10^7$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Então, de acordo com Wirtanen et al. (1996) na superfície de aço inoxidável não foi formado biofilme com 10 horas de contato, porém para as duas superfícies de PVC houve a formação de biofilmes com 8 horas de tempo de contato.

### 3 CONCLUSÃO

Foi observado um aumento da adesão de *E. coli* em função do tempo de contato para as superfícies avaliadas. Com as maiores concentrações de ácido peracético ocorreu uma redução no número de células aderida.

O tratamento controle (0% de ácido peracético) apresentou crescimento linear até 24 horas e posterior estabilização na contagem até 72 horas de contato com a superfície. O aumento na concentração de sanitizante provoca uma redução linear no Log UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli*, a partir de 24 horas de contato da bactéria com a superfície. A concentração de 0,2% reduziu aproximadamente 3 ciclos logarítmicos até 24 horas de contato da bactéria com a superfície, e em média 2 ciclos a partir de 48 horas. A concentração de ácido peracético de 0,8%, a partir de 24 horas não foi capaz de sanitizar completamente a superfície, configurando, desta forma, a formação de biofilme. A partir de 48 horas de contato a uma concentração de 2,0%, o ácido peracético não se mostrou eficaz para eliminar todas as bactérias. Com base nestes resultados, pode-se concluir que o biofilme formado, reduz significativamente a ação do sanitizante.

### REFERÊNCIAS

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

BLOCK, S. S. Desinfection, sterilization and preservation. Philadelphia: Lea & Fibiger; 1991. cap. 9, p. 167-81.

CRIADO, M.T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. *Food Technology*, Chicago, v.48, n.2, p.123-126, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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