

TATIANE KAREN CABEÇA

**SUSCETIBILIDADE DE MICRORGANISMOS RELACIONADOS COM A
CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS EM BIOFILME ARTIFICIAL E EM SUSPENSÃO
FRENTE A DESINFETANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para a obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas, na área de Microbiologia.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ELISABETH LOSHCHAGIN PIZZOLITTO

ARARAQUARA-SP

2006

TATIANE KAREN CABEÇA

**SUSCETIBILIDADE DE MICRORGANISMOS RELACIONADOS COM A
CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS EM BIOFILME ARTIFICIAL E EM
SUSPENSÃO FRENTE A DESINFETANTES**

Dissertação de Mestrado

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Análises Clínicas
UNESP-Araraquara

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Universidade Estadual Paulista – UNESP-Araraquara/SP
Orientadora e Presidente

Prof. Dr. Jonas Contiero

Universidade Estadual Paulista – UNESP-Rio Claro/SP
2º Examinador

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar-São Carlos/SP
3º Examinador

Araraquara, 10 de Agosto de 2006

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica, Centro de Referência Diagnóstica (CRD) do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC), da Universidade Auxiliar Integrada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara – UNESP, com apoio da CAPES, através da concessão da bolsa de Mestrado.

DEDICO:

*Aos meus pais, Nizete e Fernando,
que me presentearam com o mais
precioso dom: a Vida. E que
revestiram minha existência de
amor, carinho, dedicação e
iluminaram meu caminho com a luz
mais brilhante que puderam
encontrar: o Estudo.*

*Ao meu noivo Paulo, meu
grande e verdadeiro amor, pelo
apoio, paciência, confiança,
infinito amor e estímulo para
eu cumprir mais essa etapa de
minha vida.*

*À grande e admirável profissional
Talita Franco Salles, de quem me
orgulho por ter convivido algum tempo
como sua estagiária, pelo exemplo de
dedicação, força, perseverança e
sabedoria. Obrigada pela amizade!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

À minha orientadora, professora Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto, quem me abriu as portas para iniciar este projeto de vida e a realização de um grande sonho. Agradeço pela paciência e compreensão em todos os momentos, mas principalmente pelos grandes ensinamentos, pela dedicação, amizade e confiança.

Muito Obrigada!

Agradecimentos

A Deus, por permitir que eu pudesse cumprir mais uma etapa de minha vida e por permitir que eu pudesse compartilhar este momento com todas as pessoas que amo.

À minha grande amiga Isabelle, pela força, ajuda, paciência nos momentos mais difíceis, agradeço pelo companheirismo, carinho e amizade à qualquer hora.

À querida amiga Thaís, pela convivência, incentivo, pelas horas de ônibus, pelos ensinamentos e ajudas e principalmente pela amizade.

À querida amiga Sabrina Maria de Amorim, pela excelente correção final do português deste trabalho, pelas dicas durante o mestrado e sobretudo pela velha e boa amizade.

À minha irmã Érika e meu sobrinho Gabriel pelo carinho e amor.

Aos professores Jonas Contiero (UNESP - Rio Claro) e Cristina Paiva de Sousa (UFSCar) pelas valiosas sugestões técnicas.

À técnica do laboratório de microbiologia Benê, responsável pelo êxito deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia: Paul, Aline, Gabi e Anísio pela convivência, que apesar de passageira, muito agradável.

Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas com os quais dividi momentos de descontração e também de aprendizado acadêmico e de vida: Walmécio, Ana Paula, Thaís, Marília, Helen e Camila.

A Johnson-Diversey (Brasil) pela doação dos desinfetantes utilizados neste trabalho, e a seus ilustres funcionários Daniel e Carolina, pela simpatia, atenção e ajuda dispensada.

Ao professor Guastaldi (Instituto de Química, UNESP-Araraquara) que me recebeu com tanta atenção em seu laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Biomateriais (Instituto de Química, UNESP-Araraquara): Lucina, Marcos, Márcio e Alexandre, sempre muito gentis, ajudando-me a domar a máquina polítriz.

Ao responsável técnico da microscopia eletrônica (Instituto de Química, UNESP-Araraquara) Sebastião pelas longas horas na análise do material e pela boa vontade.

À funcionária Tânia do Laboratório de Bioquímica do NAC-CDR, por permitir o uso do espectrofotômetro e principalmente pela atenção, boa vontade e amizade construída.

À técnica do Laboratório de Imunologia (UNESP-Araraquara) Marisa, por permitir e auxiliar no uso do banho sonificador e da centrífuga à vacuo. Obrigada pela paciência e carinho.

Às queridas professoras Zuleica e Isolda pelas correções do português deste trabalho e principalmente pelo carinho e amizade.

Às técnicas do setor de limpeza e esterilização (NAC-CRD da UNESP-Araraquara) Cida e Marisa pela ajuda, paciência e amizade criada.

Às funcionárias do NAC-CRD da UNESP-Araraquara Maria Amélia e Fátima pela ótima convivência e amizade.

Às amigas de São Carlos, Sandra e Maria Augusta, pelo incentivo, acompanhamento deste trabalho e pela grandiosa amizade.

Aos professores Jonas Contiero (UNESP – Rio Claro) e Paschoal Batistuti (UNESP – Araraquara) pela colaboração com os membros da banca de qualificação.

À professora Vera Lúcia Tomazella (UFSCar) pela colaboração grandiosa na realização da análise estatística deste trabalho.

À bibliotecária Maria Irani pelo auxílio na elaboração desta dissertação.

Às secretarias da Pós-Graduação, Cláudia, Laura e Sônia pela atenção e ajuda dispensada.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo acolhimento e simpatia.

A todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente do desenvolvimento e finalização deste trabalho...

Muito Obrigada!

RESUMO

Avaliou-se o perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, em suspensão e em biofilme formado *in vitro*, frente à ação dos desinfetantes: ácido iodado, à base de biguanida, à base de quaternário de amônio, à base de ácido peracético e clorado, empregados comumente em indústrias alimentícias brasileiras. As técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microbiológica de viabilidade celular foram utilizadas para esta pesquisa. Os resultados demonstraram que as células microbianas em suspensão foram suscetíveis a ação de todos os desinfetantes estudados, não apresentando células viáveis após 10 minutos de tratamento com os desinfetantes. O desinfetante clorado foi o mais eficaz na eliminação das células microbianas em biofilme, proporcionando baixos valores numéricos na contagem das células viáveis e poucas células aderidas à superfície do aço inoxidável após submetido ao tratamento de 10 minutos, enquanto o desinfetante à base de biguanida mostrou ser o menos eficaz na eliminação das células microbianas em biofilme após um tratamento de 10 minutos. A idade do biofilme em horas (24, 75, 120) não mostrou ser um fator influente na resistência das células microbianas aos desinfetantes testados. Comparando-se os resultados da suscetibilidade das células microbianas em suspensão e em biofilme, foi verificado que as células em biofilme são mais resistentes à ação dos desinfetantes. O conjunto dos resultados sugerem uma deficiência de todos os desinfetantes estudados na eliminação de *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* quando em biofilme.

PALAVRAS-CHAVE: desinfetantes, suscetibilidade, células em biofilme, células em suspensão.

ABSTRACT

The susceptibility of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, in suspension and in biofilm formed *in vitro*, was studied against the action of disinfectants: iodine, biguanide, quaternary ammonium, peracetic acid and chlorine, commonly used in Brazilian food industries. The scanning electron microscopy and cellular viability techniques were used in this research. The results showed that the microbiological suspension cells were susceptible after 10 minutes of treatment with the disinfectants. The chlorine disinfectant was the most effective against microbiological cells in biofilm, showed low numbers of viable cells and few adhered cells on stainless steel surface after 10 minutes of treatment, while the biguanide disinfectant showed to be the least effective against microbiological cells in biofilm after 10 minutes of treatment. The biofilm age in hours (24, 72 and 120) didn't show to be an influential factor on resistance of microbiological cells to studied disinfectant. The comparison between the results of susceptibility of microbiological suspension cells and microbiological biofilm cells showed that the biofilm cells are more resistant to disinfectants action. The results suggest that the studied disinfectants could not eliminate *S. aureus*, *E. coli* and *L. monocytogenes* biofilms.

KEY-WORDS: disinfectants, susceptibility, biofilm cells, suspension cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Imagem fotográfica obtida por meio de câmara digital Olympus D-425 mostrando corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304 em formato quadrado de 1,0 cm x 1,0 cm. Página 32.

FIGURA 2. Fluxograma da metodologia de formação de biofilme *in vitro*. Página 36.

FIGURA 3. Fluxograma da ação dos desinfetantes sobre as células microbianas em biofilme. Página 39.

FIGURA 4. Fluxograma da metodologia para a análise por meio de microscópio eletrônico de varredura. Página 40.

FIGURA 5. Fluxograma da metodologia para a quantificação das células microbianas viáveis dos biofilmes após à ação dos desinfetantes. Página 41.

FIGURA 6. Fluxograma da metodologia da ação dos desinfetantes sobre as células microbianas em suspensão. Página 43.

FIGURA 7. Influência da ação dos desinfetantes em biofilmes de *S. aureus*. Página 47.

FIGURA 8. Influência da ação dos desinfetantes em biofilmes de *E. coli*. Página 51.

FIGURA 9. Influência da ação dos desinfetantes em biofilmes de *L. monocytogenes*. Página 55.

FIGURA 10. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando o controle negativo - superfície do aço inoxidável AISI 304 com ausência de microrganismos aderidos (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 58.

FIGURA 11. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando o controle positivo - superfície do aço inoxidável AISI 304 evidenciando células de *S. aureus* aderidas formando biofilme de 120 horas, sem tratamento com desinfetantes (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 58.

FIGURA 12. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *S. aureus* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante ácido iodado 0,20% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 59.

FIGURA 13. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *S. aureus* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de biguanida 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 59.

FIGURA 14. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *S. aureus* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de quaternário de amônio 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 60.

FIGURA 15. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando poucas células de *S. aureus* aderidas à superfície, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de ácido peracético 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 60.

FIGURA 16. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando uma única célula de *S. aureus* aderida à superfície após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante clorado 1,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A) Página 61.

FIGURA 17. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando o controle positivo - superfície do aço inoxidável AISI 304 mostrando células de *E. coli* aderidas formando biofilme de 120 horas, sem tratamento com desinfetantes (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 63.

FIGURA 18. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando células de *E. coli* aderidas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante ácido iodado 0,20% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 63.

FIGURA 19. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *E. coli* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de biguanida 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 64.

FIGURA 20. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *E. coli* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de quaternário de amônio 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 64.

FIGURA 21. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *E. coli* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de ácido peracético 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 65.

FIGURA 22. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando poucas células de *E. coli* aderidas à superfície após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante clorado 1,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A) Página 65.

FIGURA 23. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando o controle positivo - superfície do aço inoxidável AISI 304 mostrando células de *L. monocytogenes* aderidas formando biofilme de 120 horas, sem tratamento com desinfetantes (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 67.

FIGURA 24. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando células de *L. monocytogenes* aderidas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante ácido iodado 0,20% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 67.

FIGURA 25. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *L. monocytogenes* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de biguanida 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 68.

FIGURA 26. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando células de *L. monocytogenes* aderidas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de quaternário de amônio 0,50%. (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A) Página 68.

FIGURA 27. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando poucas células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de ácido peracético 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 69.

FIGURA 28. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando poucas células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante clorado 1,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A). Página 69.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *S. aureus* ATCC 6538 em biofilme de 24, 72 e 120 horas. Página 46.

TABELA 2. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *S. aureus* ATCC 6538 em suspensão (células planctônicas). Página 48.

TABELA 3. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *E. coli* ATCC 25922 em biofilme de 24, 72 e 120 horas. Página 50.

TABELA 4. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *E. coli* ATCC 25922 em suspensão (células planctônicas). Página 52.

TABELA 5. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 em biofilme de 24, 72 e 120 horas. Página 54.

TABELA 6. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 em suspensão (células planctônicas). Página 56.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
3. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Materiais	Erro! Indicador não definido.
3.1.1 Corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304	Erro! Indicador não definido.
3.1.2 Microrganismos	Erro! Indicador não definido.
3.1.3 Meios de cultura, sais e reagentes	Erro! Indicador não definido.
3.1.3.1 Meios de cultura	Erro! Indicador não definido.
3.1.3.2 Sais	Erro! Indicador não definido.
3.1.3.3 Reagentes utilizados no preparo dos corpos-de-prova para observação por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV)	Erro! Indicador não definido.
3.1.4 Desinfetantes	Erro! Indicador não definido.
3.2 Métodos	Erro! Indicador não definido.
3.2.1 Confeção, limpeza e preparação dos corpos-de-prova	Erro! Indicador não definido.
3.2.2 Preparação da suspensão microbiana	Erro! Indicador não definido.
3.2.3 Formação do biofilme in vitro sobre os corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304	Erro! Indicador não definido.
3.2.4 Preparação e aplicação dos desinfetantes	Erro! Indicador não definido.
3.2.5 Ação dos desinfetantes sobre as células do biofilme formado in vitro sobre os corpos-de-prova	Erro! Indicador não definido.

3.2.6 Procedimentos de preparação dos corpos-de-prova para análise por meio do microscópio eletrônico de varredura	Erro! Indicador não definido.
3.2.7 Procedimentos para a avaliação quantitativa de células microbianas viáveis dos biofilmes formados sobre a superfície dos corpos-de-prova	Erro! Indicador não definido.
3.2.8 Procedimentos para a avaliação quantitativa de células planctônicas viáveis em suspensão após à ação de desinfetantes	Erro! Indicador não definido.
3.2.9 Análises estatísticas	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 Quantificação do número de células viáveis após o tratamento com os desinfetantes	Erro! Indicador não definido.
4.1.1 <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	Erro! Indicador não definido.
4.1.2 <i>E. coli</i> ATCC 25922	Erro! Indicador não definido.
4.1.3 <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	Erro! Indicador não definido.
4.2. Análises por meio de microscópio eletrônico de varredura da morfologia dos biofilmes formados sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304 após o tratamento com os desinfetantes	Erro! Indicador não definido.
4.2.1 Biofilme de <i>S. aureus</i> ATCC 6538	Erro! Indicador não definido.
4.2.2 Biofilme de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.3 Biofilme de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.....	Erro! Indicador não definido.
5. DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÕES	Erro! Indicador não definido.
7. REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.
8. ANEXOS	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

Durante o processamento e a manipulação de alimentos, estes estão sujeitos à contaminações de natureza química, física e microbiológica, sendo esta última a que provoca os maiores problemas para as indústrias de alimentos e seus consumidores. Segundo dados do Food and Drug Administration (FDA), agência que regulamenta os setores de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos da América do Norte, aproximadamente dois terços das etiologias confirmadas de toxi-infecções veiculadas por alimentos estão diretamente associadas a contaminações microbiológicas ocorridas em indústrias, principalmente de origem bacteriana (FDA, 1997).

Nas indústrias alimentícias, o aço inoxidável é largamente empregado em plantas e instalações por apresentar características como: resistência à temperaturas baixas e altas, resistência à corrosão, baixa migração iônica, superfície lisa e pouco porosa, o que dificulta a aderência e retenção de microrganismos, e a neutralização em relação aos alimentos, impedindo que as propriedades organolépticas dos alimentos sejam alteradas (GÂNDARA e OLIVEIRA, 2000; STEINER et al., 2000).

Segundo Wong (1998) e Chmielewski e Frank (2003), as superfícies de aço inoxidável utilizadas em plantas e equipamentos de manipulação, estocagem ou processamento de alimentos, são reconhecidas como as principais fontes de contaminação microbiana. A contaminação dos alimentos ocorre quando o alimento entra em contato com as superfícies contaminadas ou via exposição a aerossóis originados dessas superfícies (GIBSON et al., 1999; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

A condição higiênica de equipamentos e superfícies de processamento é controlada pela aplicação de sistemas de limpeza (*clean-in-place*) e desinfecção, os quais auxiliam na remoção ou controle de microrganismos aderidos à superfícies que podem eventualmente entrar em contato com os alimentos processados (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

Nos procedimentos de desinfecção em indústrias, um desinfetante efetivo deve ser usado e uma concentração apropriada do desinfetante deve ser aplicada. Uma concentração muito diluída do desinfetante aumenta o risco de contaminação do alimento e da aquisição de resistência do microrganismo ao desinfetante (LUPPENS et al., 2002).

Mesmo com a implantação de sistemas de qualidade nas indústrias alimentícias e com a aplicação de efetivos agentes desinfetantes, os microrganismos não são completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos. A retenção e o acúmulo de microrganismos em tais ambientes contribuirão para o desenvolvimento de biofilmes, os quais podem conter microrganismos patogênicos (KUMAR e ANAND, 1998; MITTELMAN, 1998; WONG, 1998; BOS et al., 2000).

Os biofilmes têm sido definidos como uma comunidade sésil de organismos, caracterizada por células que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, interface ou entre si, embutidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzida por estes microrganismos e que apresentam um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Os microrganismos formam o biofilme, da mesma maneira em qualquer ecossistema que habitam (ambiental, industrial e médico) (DONLAN e COSTERTON, 2002).

A formação do biofilme inicia-se com a adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas na superfície, formando um filme condicionante. Em instalações de indústrias alimentícias, proteínas de produtos derivados do leite ou de carnes são elementos importantes para formar a camada condicionante, os quais contém receptores específicos permitindo a aderência de microrganismos (KUMAR e ANAND, 1998; WATNICK e KOLTER, 2000).

As propriedades físico-químicas da superfície exercem uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos (YOKOO, 2004). Superfícies hidrofílicas, como a superfície de aço inoxidável utilizada em instalações industriais, permitem uma grande adesão bacteriana (SINDE e CARBALLO, 2000; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

O pH, o nível de nutrientes e a temperatura podem também ter um papel na taxa de adesão bacteriana a uma superfície (COSTERTON et al., 1987; DONLAN e COSTERTON, 2002; TRACHOO, 2003; YOKOO, 2004).

As condições dos ambientes industriais onde se processam os alimentos, tais como: fluxo de água, concentração ampla de alimentos e a presença de materiais crus, favorecem a aderência bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes (GIBSON et al., 1999).

Propriedades da superfície da célula, como a presença de flagelo, pili, proteínas adesinas, lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicóico e cápsula, influenciam na aderência à superfície (PIETTE e IDZIAK, 1991; RATNER, 1996; KUMAR e ANAND,

1998; SMOOT e PIERSON, 1998; PRAKASH et al., 2003; TRACHOO, 2003), a qual ocorre de 5 a 30 segundos em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível (MITTELMAN, 1998).

A adesão reversível é uma interação inicial fraca da bactéria com um substrato. Isso envolve forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Durante a adesão reversível, as bactérias ainda exibem movimentos Brownianos e são facilmente removidas pela aplicação de uma força mínima (WATNICK e KOLTER, 2000; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

A adesão irreversível resulta do ancoramento de apêndices (pili, flagelo, proteínas adesina) e/ou da produção de polímeros extracelulares (SUTHERLAND, 1997). A união entre apêndices da bactéria e o substrato envolve forças fracas, tais como: interação dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, hidrofóbica e ligação covalente e iônica. Essa união geralmente ocorre com poucas horas de contato. Vários estudos indicam que a adesão irreversível começa a partir de 20 minutos a no máximo 4 horas a 4-20° C (HOOD e ZOTTOLA, 1995; SMOOT e PIERSON, 1998). A remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil e requer aplicação de uma forte força mecânica ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, desinfetantes e/ou por calor (SINDE e CARBALLO, 2000).

Outro fator que também está diretamente relacionado com a adesão microbiana é a capacidade que os microrganismos têm de produzir polissacarídeos extracelulares, levando à formação de uma matriz, glicocálice ou *slime* responsável pela estrutura dos biofilmes. O *slime* é constituído de polissacarídeos extracelulares com 99,0% de água e canais para transporte de água e nutrientes (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990; VIDAL et al., 1996; AN e FRIEDMAN, 1997; ISTA et al., 1999; PARK

et al., 2000; MAH e O' TOOLE, 2001; SUTHERLAND, 2001; DONLAN, 2002; DONLAN e COSTERTON, 2002; DUNNE, 2002).

Os polissacarídeos extracelulares sintetizados pelas células microbianas variam grandemente em sua composição e, portanto, em suas propriedades químicas e físicas. As moléculas que compõem os polissacarídeos extracelulares podem ser macromoléculas neutras, iônicas ou aniônicas, sendo esta última a mais presente (SUTHERLAND, 2001).

A matriz de substâncias poliméricas extracelulares pode conter polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios, ácido teicóico, ácido nucléico e outras substâncias poliméricas hidratadas com 85% a 95% de água (SUTHERLAND, 1997; PRAKASH et al., 2003).

Os polissacarídeos extracelulares podem interagir com uma grande variedade de outras moléculas, incluindo lecitinas e lipídios, bem como com outros polissacarídeos (SUTHERLAND, 2001).

A quantidade de polissacarídeos extracelulares sintetizados pelas células em biofilme depende da disponibilidade de substratos de carbono (tanto no interior quanto no exterior da célula) e do equilíbrio entre a fonte de carbono e outros nutrientes. A presença excessiva de carbono e uma limitação de outros nutrientes, como o nitrogênio, comprometerão a síntese dos polissacarídeos extracelulares (SUTHERLAND, 2001).

As substâncias poliméricas extracelulares são produzidas em resposta à aderência e estímulos ambientais, tais como: pressão osmótica, pH, temperatura e falta de nutrientes. Essas substâncias proporcionam proteção aos organismos do biofilme fornecendo concentração de nutrientes, prevenindo o acesso de biocidas,

seqüestrantes de metais e toxinas, e prevenindo a dessecação (PROSSER et al., 1987; SUTHERLAND, 1997).

Com o aumento da população microbiana, forma-se um ambiente anaeróbio no interior do biofilme, provocando um aumento de ácidos e de gás insolúvel que enfraquece a estrutura do biofilme, onde fragmentos deste podem se desprender (PIZZOLITTO, 1997; HABASH e REID, 1999; STOODLEY et al., 2002; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003; TRACHOO, 2003). Desprendimento é usado para descrever a liberação de células (individuais ou em grupos) de um biofilme ou superfície. O desprendimento é um evento ativo, regulado fisiologicamente, mas poucos estudos têm sido realizados para demonstrar a base biológica deste processo (STOODLEY et al., 2001).

Costerton (1999) sugeriu que o desprendimento de células do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* envolve a ação de uma enzima.

Stoodley et al (2002) suspeitaram que o aumento na concentração de uma molécula indutora é responsável pela liberação de enzimas que degrada a matriz de polímeros, resultando no desprendimento de células do biofilme. A densidade celular dependente da regulação pode também desencadear a liberação de enzimas que degradam a matriz, permitindo que a bactéria se disperse do biofilme, quando alcança um alto nível de organismos nas microcolônias do biofilme.

O desprendimento de células bacterianas do biofilme é de fundamental importância. Biofilmes microbianos formados em equipamentos e instalações de indústrias alimentícias podem desprender-se e contaminar o alimento presente na superfície ou, então, colonizar e iniciar um novo biofilme em uma nova superfície, proporcionando uma nova fonte de contaminação (NORWOOD e GILMOUR, 1999).

A formação do biofilme é uma estratégia de sobrevivência de microrganismos em um ambiente com condições adversas (TRACHOO, 2003), o que provoca uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil (aderidas) (MITTELMAN, 1998; COSTERTON, 1999; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

Células crescidas em biofilme expressam propriedades distintas das células planctônicas, uma das quais é o aumento na resistência aos biocidas e agentes antimicrobianos (LeCHEVALIER et al., 1988; HOLAH et al., 1990; MOSTELLER e BISHOP, 1993; WALKER et al., 1994; EGINTON et al., 1998; TRACHOO, 2003). De fato, quando células existem em um biofilme, elas podem vir a ser 10 - 1.000 vezes mais resistentes aos efeitos de agentes antimicrobianos químicos, como os desinfetantes utilizados por indústrias processadoras de alimentos (WILSON, 1995; MITTERMAN, 1998; BERESFORD et al., 2001; MAH e O'TOOLE, 2001), podendo proporcionar a sobrevivência de patógenos envolvidos com a contaminação de alimentos em ambientes de processamento dos mesmos (KUMAR e ANAND, 1998; MITTELMAN, 1998; WONG, 1998; PARKAR et al., 2004).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define desinfetantes como formulações que têm na sua composição substâncias microbicidas e apresentam efeito letal sobre microrganismos não esporulados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988). Os desinfetantes mais utilizados na desinfecção de superfícies e equipamentos de indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem os princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

Os compostos clorados, iodados e à base de ácido peracético são comumente empregados como sanitizantes em indústrias devido a suas características oxidantes, apresentando um amplo espectro biocida. Os compostos quaternários de amônio são sanitizantes surfactantes catiônicos efetivos contra bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, fungos e bolores (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

Numerosas pesquisas sustentam o conceito que bactérias aderidas são mais resistentes à biocidas do que organismos em suspensão. Testes recentes sobre a eficácia de desinfetantes estão sendo direcionados à bactérias aderidas em superfícies e crescidas como um biofilme (EGINTON et al., 1998).

LeChevalier et al. (1987) comprovaram que os microrganismos aderidos foram entre 150 e 3.000 vezes mais resistentes à ação do ácido hipocloroso do que os microrganismos não aderidos (em suspensão); quanto à ação de monocloramina foram de 2 a 100 vezes mais resistentes.

Frank e Koffi (1990) mostraram que as células de *Listeria monocytogenes* não aderidas (em suspensão) foram eliminadas em 30 segundos após o contato com o sanitizante cloreto de benzalcônio, enquanto que as células aderidas resistiram ao mesmo sanitizante de 10 a 20 minutos.

Trachoo e Frank (2002) mostraram que em uma inativação experimental de biofilme de *C. jejuni*, compostos quaternários de amônio, ácido peracético e uma mistura de ácido peracético e ácido peroctanóico não puderam eliminar o biofilme depois do tratamento de 50 e 200 ppm por 45 segundos.

LeChevalier et al. (1988) estudaram os fatores que promovem a sobrevivência da bactéria em suplementos de água clorada. Observaram que a idade do biofilme, encapsulamento bacteriano e condições de crescimento aumentam a

resistência do biofilme ao cloro, e que as substâncias poliméricas extracelulares atuam como uma barreira responsável pela falha dos agentes desinfetantes em penetrar no biofilme.

De Beer et al. (1994), durante uma desinfecção com cloro usando um microeletrodo, mediram a transição da concentração deste cloro em biofilmes de *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Os autores concluíram que a penetração de cloro dentro do biofilme e a proporção da penetração variou dependendo da localização, da heterogeneidade na distribuição de biomassa e no hidrodinamismo do local.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno da resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos químicos (MAH e O'TOOLE, 2001; CAMPANAC et al., 2002), tais como: penetração retardada desses agentes dentro da matriz extracelular do biofilme, diminuição da taxa de crescimento dos organismos em biofilme ou outras mudanças fisiológicas provocadas pela interação dos organismos com a superfície (DE BEER et al., 1994; DONLAN, 2000).

O mecanismo de *Quorum sensing*, no qual as bactérias produzem moléculas extracelulares para comunicar-se entre si e coordenar suas atividades, parece estar relacionado com o fenômeno da resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos, embora o seu papel na resistência não esteja ainda claro (MAH e O'TOOLE, 2001).

Várias reações podem acontecer para provocar a redução da sensibilidade de bactérias contidas em biofilme a desinfetantes, tais como: interação química entre o desinfetante e o próprio biofilme, modulação do microambiente,

produção de enzimas degradantes e neutralizantes químicos e troca genética entre células em um biofilme (AUGUSTIN et al., 2004).

O aumento da resistência dos biofilmes aos desinfetantes tem dificultado a sua eliminação nos ambientes de processamento de alimentos em indústrias. A não eliminação desses biofilmes vem se tornando um fator preponderante em surtos de doenças transmitidas por alimentos causados por microrganismos patogênicos (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003), incluindo: *Escherichia coli* 0157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus* spp. *fetus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus* (TAUXE, 1997; MEADS et al., 1999).

As doenças transmitidas por alimentos representam um grau considerável de morbidade e mortalidade, especialmente em populações clinicamente debilitadas (FERNANDES et al., 2000). Enquanto muitas dessas doenças são de natureza gastrointestinal, algumas podem afetar outras partes do organismo, tais como: músculos, sistema nervoso ou órgãos como o coração (PELCZAR et al., 1996).

As duas grandes categorias de doenças microbianas transmitidas por alimentos são: intoxicação alimentar e infecções transmitidas por alimentos (PELCZAR et al., 1996; SCHAECHTER et al., 2002).

A intoxicação alimentar ocorre após a ingestão de alimentos contaminados com toxinas pré-formadas produzidas por microrganismos como *Staphylococcus aureus*, sendo a toxina responsável pelos sintomas clínicos. As infecções transmitidas por alimentos ocorrem quando o patógeno é ingerido e se multiplica dentro do organismo. Tais infecções causam, usualmente, doenças do trato

intestinal, embora outras áreas do corpo possam também ser afetadas (PELCZAR et al., 1996; SCHAECHTER et al., 2002).

O consumo de alimentos contaminados, pode ser causador de diversas patologias no ser humano, e representa hoje um dos principais problemas de Saúde Pública, tendo como causa imediata a redução na produtividade econômica do país (FORSYTHE, 2002).

Além de infecções e intoxicações alimentares, a presença de biofilmes em ambientes de indústrias processadora de alimentos pode ocasionar corrosões e danos nos equipamentos e a contaminação com microrganismos deteriorantes, que podem alterar o sabor e a qualidade do alimento processado (WONG, 1998; SINDE e CARBALLO, 2000; PARKAR et al., 2004).

O melhor caminho para controlar os biofilmes baseia-se na prevenção de seu desenvolvimento. Programas de limpeza e desinfecção que combinam métodos físicos e químicos poderão prevenir o acúmulo de resíduos de produtos alimentícios e células bacterianas em equipamentos e superfícies (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

Um procedimento de limpeza eficaz contra células em biofilme deve ser capaz de interromper ou dissolver a matriz de substâncias poliméricas extracelulares, permitindo que os agentes desinfetantes possam ter acesso à células viáveis (HOOD e ZOTTOLA, 1995; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

Atualmente, vários métodos são usados na detecção e monitoramento da carga microbiana de superfícies envolvidas na produção de alimentos. Os métodos convencionais incluem amostragens utilizando “swab” e placa de contato (CHAE e SCHRAFT, 2001).

Os métodos de avaliação de biofilmes em superfícies podem ser realizados por meio de microscopia de contraste, de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM) (COSTA, 1999).

A microscopia de contraste é recomendada para acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real (COSTA, 1999). Já a microscopia de epifluorescência (EPF) é uma alternativa excelente na quantificação de células aderidas às superfícies. Para visualizar a adesão bacteriana, usam-se substâncias fluorescentes, como o alaranjado de acridina, para coloração direta das células, permitindo sua observação (COSTA, 1999).

A microscopia de força atômica é baseada em leis elementares da Física e conta com a moderna tecnologia de semicondutores. O microscópio de força atômica mede a força que vem da interação entre os átomos da ponta com os átomos da superfície em estudo. Com esse tipo de microscopia pode-se estudar a topografia e as propriedades mecânicas de superfícies, tais como: atrito, rugosidade, dureza, rigidez, elasticidade e resistência (HERRMANN et al., 1997).

As técnicas de microscopia eletrônica apresentam alto poder de resolução e comprimento de onda muito curto (0,5 Å) de feixe de elétrons, permitindo observar as amostras em aumentos maiores quando comparado com a microscopia óptica comum. Na microscopia eletrônica de varredura, a amostra é submetida a um fino feixe de elétrons, os quais movem sobre a superfície da amostra, provocando a liberação de elétrons secundários, que são coletados por um detector, gerando um sinal eletrônico. O microscópio eletrônico de varredura mostra uma imagem tri-dimensional, e a superfície topográfica da amostra é revelada com nitidez (PIZZOLITTO, 1997).

Os materiais biológicos geralmente são maus condutores de eletricidade e calor, por conseguinte, não podem ser observados ao microscópio eletrônico de varredura, a menos que sejam transformados em materiais eletricamente condutivos. A cobertura desses materiais com uma fina camada (cerca de 30 nm) de ouro ou uma liga de ouro e paládio é o meio utilizado para solucionar esse problema (PIZZOLITTO, 1997).

Visto que biofilmes microbianos são de difícil remoção de uma superfície sólida, e por apresentarem a característica de resistência aumentada à ação de agentes antimicrobianos químicos, fomos estimulados a estudar o perfil de susceptibilidade de biofilmes microbianos formados *in vitro* sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, comumente o mais utilizado nas indústrias. Desta forma, foi realizada uma avaliação dos desinfetantes empregados nas indústrias alimentícias quanto à sua eficácia na remoção dos biofilmes microbianos, que indevidamente removidos das superfícies, equipamentos e ambientes de processamento que entram em contato com alimentos, podem ocasionar a contaminação do produto, infecções médicas, além de causar danos nos equipamentos.

2. OBJETIVOS

1. Induzir a formação *in vitro* de biofilmes dos microrganismos: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922 sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304.
2. Analisar, por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV), a morfologia dos biofilmes microbianos formados sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, antes e após a ação dos desinfetantes selecionados para o estudo.
3. Quantificar as células microbianas viáveis de biofilmes formados em 24, 72 e 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, antes e após a ação dos desinfetantes selecionados para o estudo.
4. Avaliar comparativamente células em suspensão e células em biofilme quanto à suscetibilidade aos desinfetantes selecionados para o estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304 (1,0 cm x 1,0 cm)



FIGURA 1. Imagem fotográfica obtida por meio de câmara digital Olympus D-425 mostrando corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304 em formato quadrado de 1,0 cm x 1,0 cm.

3.1.2 Microrganismos

- *Listeria monocytogenes* ATCC 7644
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Cepas cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro (FIOCRUZ).

3.1.3 Meios de cultura, sais e reagentes

3.1.3.1 Meios de cultura

Os meios de cultura Bacto Letheen Broth, Bacto Tryptic Soy Agar (TSA), Bacto Tryptic Soy Broth (TSB) e Bacto Mueller Hinton Broth, todos da marca DIFCO, foram utilizados neste estudo e preparados de acordo com as especificações do fabricante.

3.1.3.2 Sais

Os sais utilizados no preparo da Salina fisiológica 0,9%, do Tampão fosfato PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,1M pH 7,2 e dos demais reagentes utilizados no preparo dos corpos-de-prova para as observações por meio de microscopia eletrônica de varredura, eram de procedência MERCK (Darmstadt, Germany), REAGEN (Quimibrás Indústria Química; Rio de Janeiro, Brasil) e BIOBRÁS (Bioquímica do Brasil; Minas Gerais, Brasil).

3.1.3.3 Reagentes utilizados no preparo dos corpos-de-prova para observação por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Tampão Fosfato 0,2M; Tampão Fosfato 0,2 M [pH 7,1]; Tampão Fosfato 0,1 M [pH 7,1]; Solução Tampão 0,1 M-glutaraldeído a 2,5%; Solução de etanol a 15, 30, 50, 70, 90 e 100%.

3.1.4 Desinfetantes

- Desinfetante ácido iodado (Divosan MH)
- Desinfetante à base de biguanida (Divosan Divosept 350)
- Desinfetante à base de quaternário de amônio (Divosan Divoquat Forte)
- Desinfetante à base de ácido peracético (Divosan Forte)
- Desinfetante clorado (Divosan Hypochlorite)

Os desinfetantes supracitados da marca Johnson Diversey Brasil – São Paulo/SP foram selecionados para este estudo e preparados de acordo com as especificações do fabricante.

3.2 Métodos

3.2.1 Confeção, limpeza e preparação dos corpos-de-prova

Os corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304 em formato quadrado (1,0 cm x 1,0 cm) foram adquiridos comercialmente - ICAM (Indústria e Comércio Ltda - São Carlos/SP). A limpeza dos corpos-de-prova foi realizada por imersão em acetona por 24 horas em temperatura ambiente (segundo NORWOOD e GILMOUR, 1999) e posterior enxágüe com água destilada. Após realizada a limpeza dos corpos-de-prova, as superfícies destes foram submetidas a um polimento em máquina politriz (MAXIPLAN[®]), inicialmente com lixa d'água abrasiva (3M[®]) de granulometria 600 e, posteriormente, com granulometria 1.500. A seguir, os corpos-de-prova foram submetidos a um banho sonicador de 40 KHz por 15 minutos para a remoção de resíduos do polimento, lavados com

água deionizada e colocados em erlemeyer (100 mL) contendo 50 mL de água deionizada e foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121° C.

3.2.2 Preparação da suspensão microbiana (MONTVILLE e SCHAFFNER, 2003)

As cepas liofilizadas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram reativadas segundo especificações da FIOCRUZ. Com cada cepa reativada foi preparado um inóculo em 5 mL de Caldo TSB com turvação aproximada a 0,5 da escala Mac Farland. O inóculo preparado foi incubado a 35-37° C sob agitação constante de 150 rpm em agitador orbital (MARCONI®) por 18-24 horas. Essa cultura foi centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos e lavada três vezes com 5,0 mL de tampão PBS. O *pellet* de células microbianas foi resuspenso em 3,0 mL de tampão PBS e a turvação da suspensão foi monitorada por densidade ótica (DO) em espectrofotômetro (FEMTO) até atingir aproximadamente 0,5 em absorbância de 660 nm, correspondendo a uma suspensão microbiana de aproximadamente 10⁸ UFC/mL.

3.2.3 Formação do biofilme *in vitro* sobre os corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304 (PIZZOLITTO et al., 2001)

Listeria monocytogenes ATCC 7644 - para formar *in vitro* o biofilme com esse microrganismo, vinte e quatro corpos-de-prova de aço inoxidável AISI 304 (1,0 x 1,0cm) esterilizados foram colocados, separadamente, em tubos Falcon

(50,0 mL) contendo 15,0 mL de Caldo Mueller Hinton (DIFCO) e 20,0µl da suspensão microbiana de *L. monocytogenes* na ordem de 10^8 UFC/mL (como descrito no item 3.2.2). Os tubos foram incubados a 37° C sob agitação constante de 100 rpm em agitador orbital (MARCONI®) por: 24 horas (6 corpos-de-prova), 72 horas (6 corpos-de-prova) e 120 horas (12 corpos-de-prova). O caldo Mueller Hinton, presente nos tubos Falcon, foi trocado a cada três dias. Decorridos os períodos de incubação, os corpos-de-prova foram retirados e lavados separadamente com 10 mL de salina fisiológica esterilizada.

Os mesmos procedimentos descritos foram repetidos para a formação do biofilme com os microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

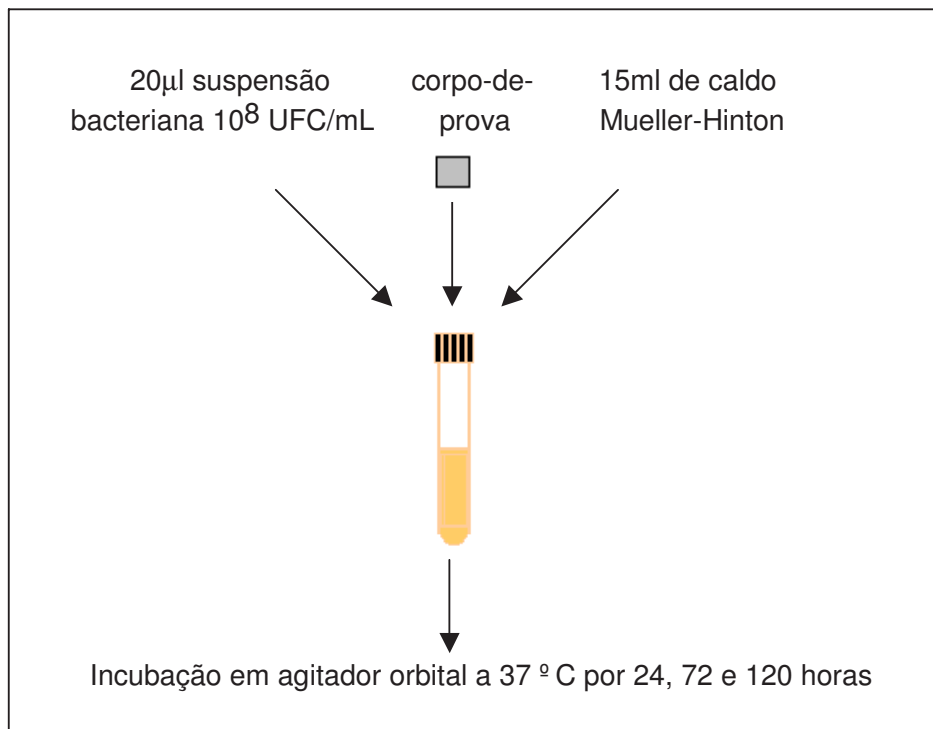


FIGURA 2. Fluxograma da metodologia de formação de biofilme *in vitro*.

3.2.4 Preparação e aplicação dos desinfetantes

Os desinfetantes selecionados para o estudo foram diluídos em água destilada conforme indicado em suas respectivas fichas técnicas, preparados no momento da utilização, e não reaproveitados. Foram preparadas as seguintes concentrações de cada um dos desinfetantes conforme indicado nas fichas técnicas dos mesmos:

- Desinfetante ácido iodado (Divosan MH) à concentração de 0,20%
- Desinfetante à base de biguanida (Divosan Divosept 350) à concentração de 0,50%
- Desinfetante à base de quaternário de amônio (Divosan Divoquat Forte) à concentração de 0,50%
- Desinfetante à base de ácido peracético (Divosan Forte) à concentração de 0,50%
- Desinfetante clorado (Divosan Hypochlorite) à concentração de 1,50%

Após a formação dos biofilmes, cinco corpos-de-prova dos seis que permaneceram incubados por 24 horas, cinco corpos-de-prova dos seis incubados por 72 horas e cinco corpos-de-prova dos doze incubados por 120 horas, foram submetidos à ação dos desinfetantes selecionados para o estudo (ácido iodado, à base de biguanida, à base de quaternário de amônio, à base de ácido peracético e clorado) (descrito no próximo item 3.2.5) e, posteriormente, foram destinados à uma avaliação quantitativa de viabilidade celular (item 3.2.7). Como controle positivo, foi usado um corpo-de-prova de cada um dos períodos

de incubação (24h, 72h e 120h) sem ter sido submetido à ação de nenhum desinfetante.

Após a realização dos ensaios descritos, dos seis corpos-de-prova que permaneceram incubados por 120 horas, cinco foram submetidos à ação dos desinfetantes (ácido iodado, à base de biguanida, à base de quaternário de amônio, à base de ácido peracético e clorado) (item 3.2.5). Após o procedimento de desinfecção, os cinco corpos-de-prova foram preparados para a microscopia eletrônica de varredura como descrito nos procedimentos do item 3.2.6. Como controle positivo, foi usado um corpo-de-prova (120 horas) que não foi submetido à ação de nenhum desinfetante.

3.2.5 Ação dos desinfetantes sobre as células do biofilme formado *in vitro* sobre os corpos-de-prova (MIYANO et al., 2003)

Essa prova foi realizada em temperatura ambiente. Após a formação do biofilme sobre os corpos-de-prova, estes foram colocados, individualmente, em placas de Petri (90 x 15 mm). Cada placa de Petri recebeu separadamente 20,0 mL de cada desinfetante: ácido iodado (0,20%), à base de biguanida (0,50%), à base de quaternário de amônio (0,50%), à base de ácido peracético (0,50%) e clorado (1,50%). Após dez minutos de contato, os corpos-de-prova foram removidos das placas de Petri, lavados com 10 mL de salina fisiológica esterilizada, transferidos para tubos de ensaio (13 x 100 mm) contendo 5,0 mL de Caldo Lethen para neutralizar a ação dos desinfetantes e, após 5 minutos, foram retirados e lavados novamente com 10 mL de salina fisiológica esterilizada.

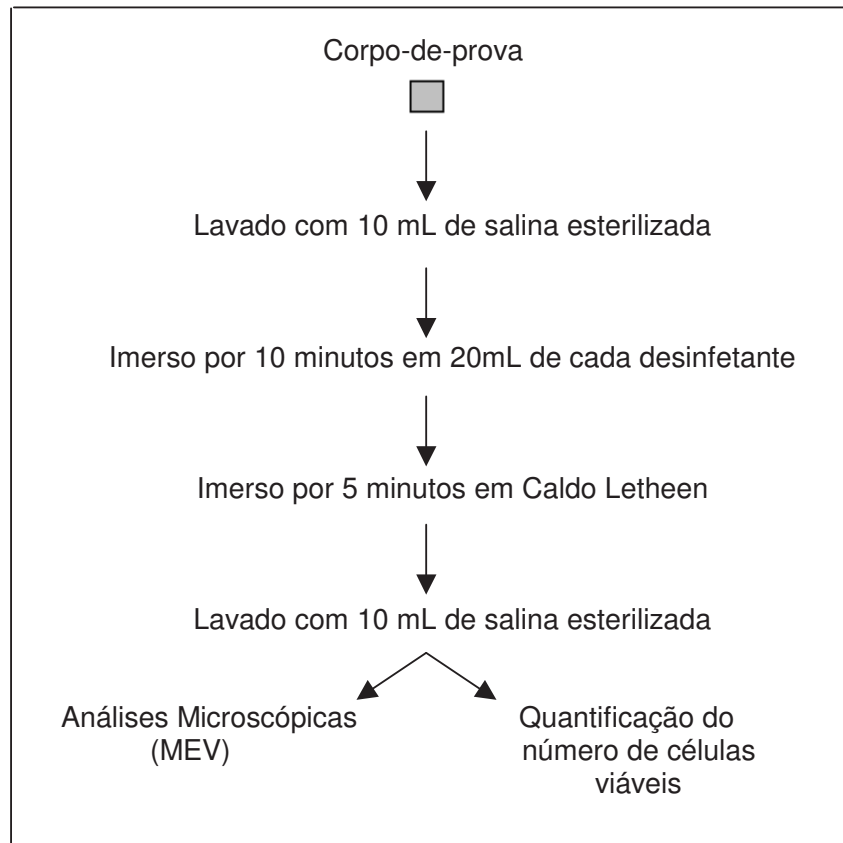


FIGURA 3. Fluxograma da ação dos desinfetantes sobre as células microbianas em biofilme.

3.2.6 Procedimentos de preparação dos corpos-de-prova para análise por meio do microscópio eletrônico de varredura (PIZZOLITTO, 1997)

Os corpos-de-prova foram imersos em glutaraldeído a 2,5%, em Tampão Fosfato 0,1 M (pH 7,1) durante 15 minutos para a fixação dos microrganismos. Foram desidratados em soluções de álcool (15,30,50,70,90 e 100%) por 15 minutos cada um, secos em centrifuga a vácuo por 5 minutos, metalizados com ouro (1KV, 15 mAp, 2 minutos) no aparelho Edward S150B para tornar a amostra

condutora e, em seguida, montados em suportes metálicos específicos do equipamento, e foram examinados por meio de microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-T330A).

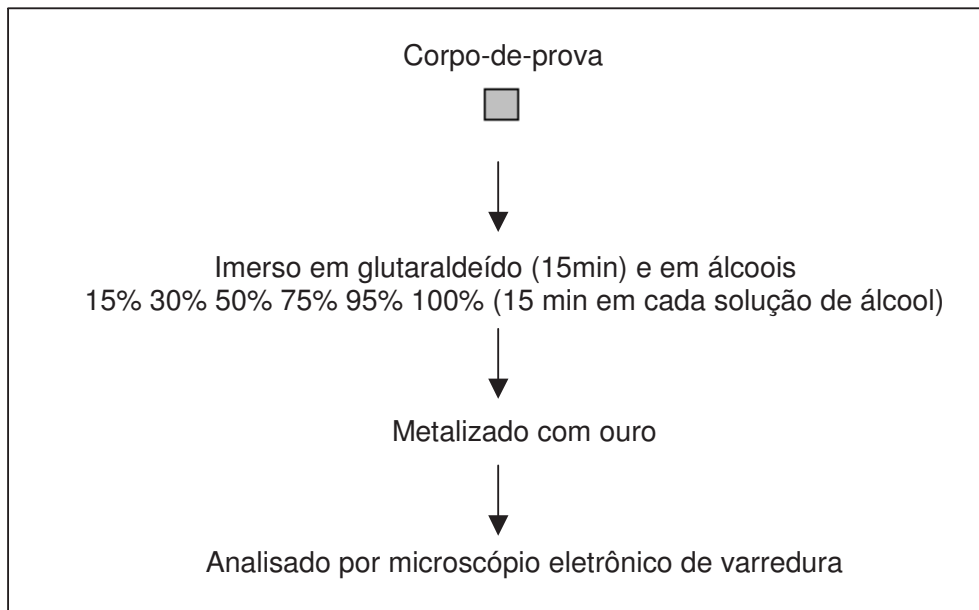


FIGURA 4. Fluxograma da metodologia para a análise por meio de microscópio eletrônico de varredura.

3.2.7 Procedimentos para a avaliação quantitativa de células microbianas viáveis dos biofilmes formados sobre a superfície dos corpos-de-prova (MIYANO et al., 2003)

Os corpos-de-prova foram colocados em tubos com tampa de rosca (13 x 100mm) contendo 5,0 mL de salina fisiológica esterilizada e, foram sonicados em banho de 40 KHz por oito minutos para a recuperação das células microbianas aderidas sobre a superfície dos corpos-de-prova, e submetidos a vortex por 10 segundos. Após este procedimento, realizaram-se diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} ,

10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) de cada amostra em salina fisiológica esterilizada. A seguir, 1,0 mL da suspensão pura e de cada diluição preparada foi semeado em profundidade (técnica de *pour plate*) em placas (90 x 15 mm) contendo Bacto Tryptic Soy Agar (TSA), homogeneizado e incubado a 35-37°C em estufa bacteriológica. As colônias crescidas foram contadas após 24-48 horas, e foi calculado o total de UFC/cm² expressos em logaritmos (log UFC/cm²). Os números em logaritmos foram obtidos por meio de calculadora eletrônica científica. O ensaio descrito foi realizado em triplicata.

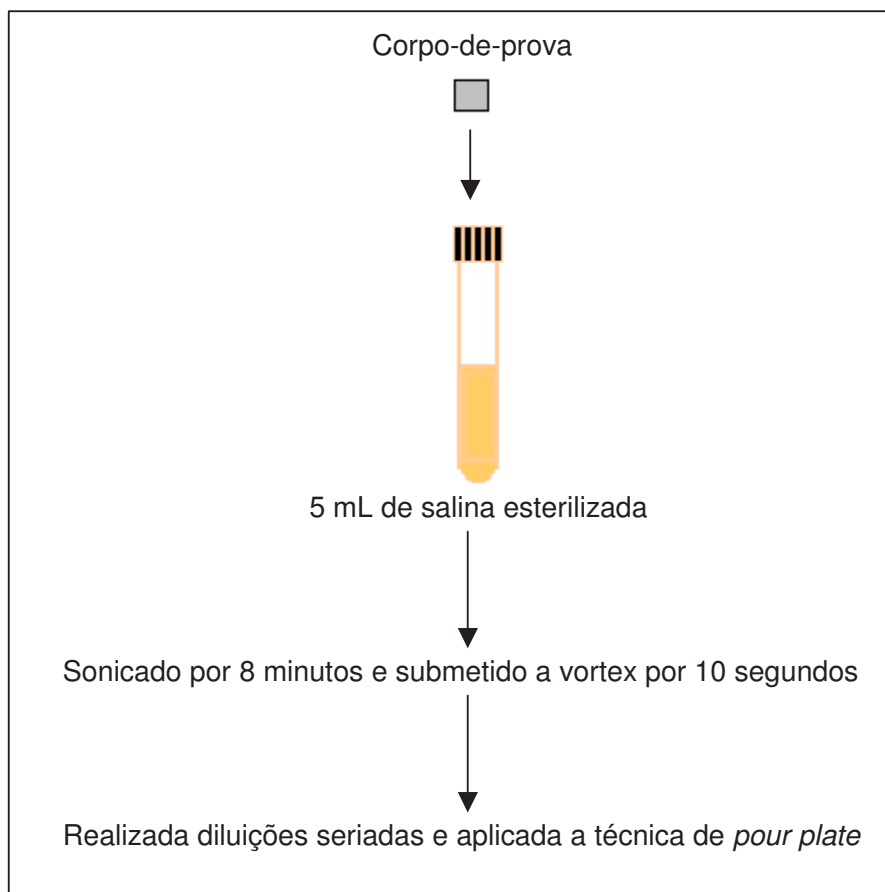


FIGURA 5. Fluxograma da metodologia para a quantificação das células microbianas viáveis dos biofilmes após à ação dos desinfetantes.

3.2.8 Procedimentos para a avaliação quantitativa de células planctônicas viáveis em suspensão após à ação de desinfetantes (MIYANO et al., 2003)

Em tubos com tampa de rosca (13 x 100mm) contendo, separadamente, 4,95 mL de cada desinfetante: ácido iodado (0,20%), à base de biguanida (0,50%), à base de quaternário de amônio (0,50%), à base de ácido peracético (0,50%) e clorado (1,50%), foi adicionado 0,05 mL (50 µl) de uma suspensão na ordem de 10^8 UFC/mL de cada microrganismo: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Realizou-se um controle positivo adicionando, separadamente, 50,0 µl de cada uma das suspensões bacterianas a tubos contendo 4,95 mL de tampão PBS. Os tubos foram submetidos a agitação por meio de vortex por 10 segundos e conservados em repouso por dez minutos. Decorrido este período, 0,5 mL (500 µl) de cada suspensão bacteriana foi adicionado em tubo de ensaio (13 x 100mm) contendo 4,5 mL de Caldo Lethen, e submetidos a agitação (vortex) por dez segundos. Realizaram-se diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) de cada amostra em salina fisiológica esterilizada. A seguir, 1,0 mL da suspensão pura e de cada diluição preparada foi semeado em profundidade (técnica de *pour plate*) em placas (90 x 15 mm) contendo Bacto Tryptic Soy Agar (TSA), homogeneizado e incubado a 35-37°C em estufa bacteriológica. As colônias crescidas foram contadas após 24-48 horas e foi calculado o total de UFC/mL expressos em logaritmos (log UFC/mL). Os números em logaritmos foram obtidos por meio de calculadora eletrônica científica. O ensaio descrito foi realizado em triplicata.

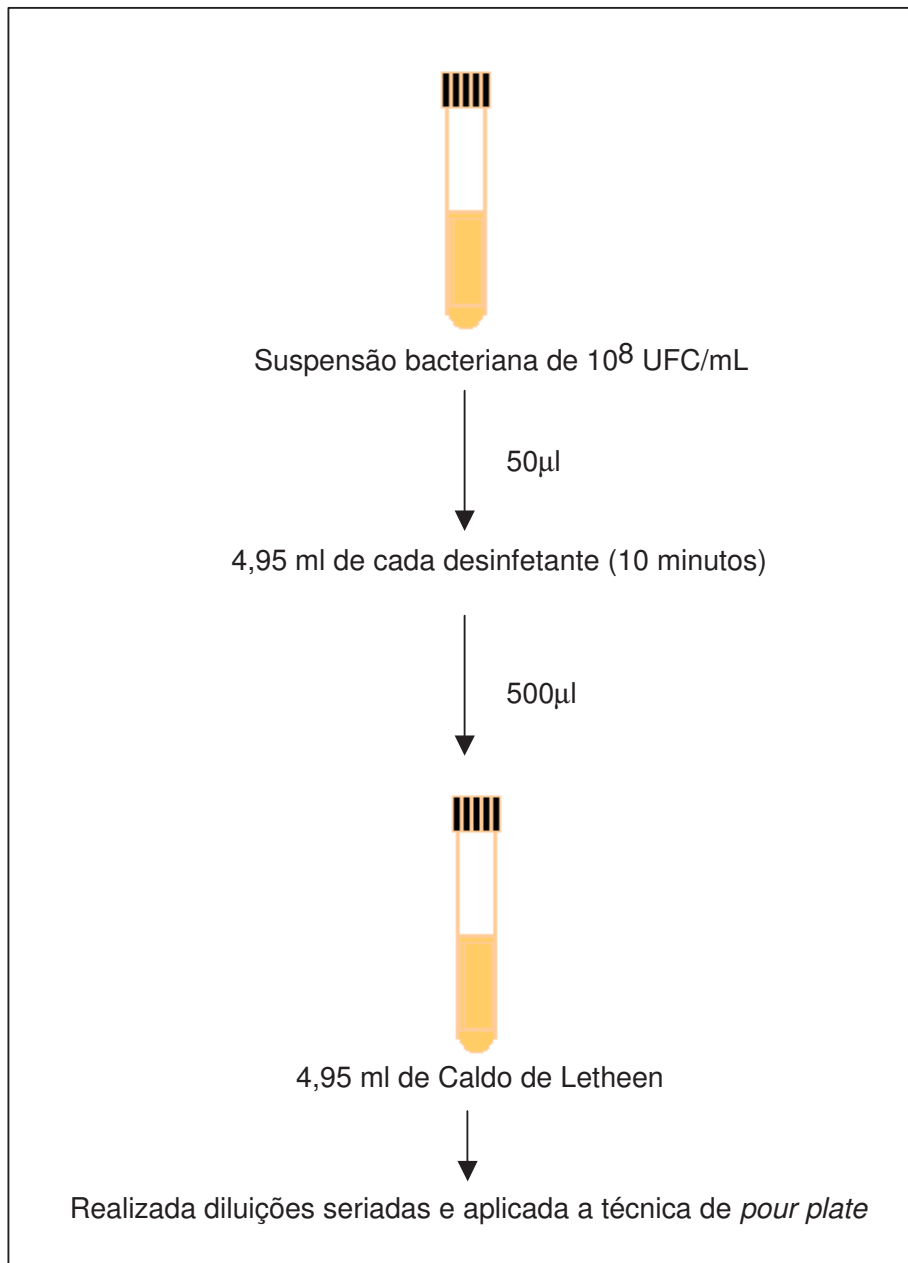


FIGURA 6. Fluxograma da metodologia da ação dos desinfetantes sobre as células microbianas em suspensão.

3.2.9 Análises estatísticas

Para a avaliação estatística dos dados obtidos com a quantificação do número de células viáveis após o tratamento com os desinfetantes foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA). A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Nos grupos em que foram constatadas diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados das análises estatísticas dos dados foram obtidos via software MINITAB (versão 13.1).

4. RESULTADOS

4.1 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS APÓS O TRATAMENTO COM OS DESINFETANTES

4.1.1 *S. aureus* ATCC 6538

As médias da quantificação do número de células viáveis de *S. aureus* em biofilme de 24, 72 e 120 horas após o tratamento com os desinfetantes estudados estão apresentadas na tabela 1. Diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,000$) foram observadas após o tratamento das células microbianas com os desinfetantes. Isso significa que a ação dos desinfetantes teve influência na contagem do número de células viáveis de *S. aureus*. Quando comparado com o controle positivo, observamos que os desinfetantes à base de ácido peracético e clorado foram os mais eficazes na eliminação de células de *S. aureus*, isto é, baixos números de células viáveis expressos em logaritmos de unidades formadoras de colônias por cm^2 ($\log \text{UFC}/ \text{cm}^2$) foram obtidos após o tratamento com estes desinfetantes, sendo que o desinfetante clorado mostrou ser o mais eficaz. O desinfetante à base de biguanida mostrou ser o menos eficaz na eliminação das células de *S. aureus*, seguido dos desinfetantes à base de quaternário de amônio e ácido iodado. Estes resultados são confirmados estatisticamente por meio do teste de comparação múltipla de Tukey.

TABELA 1. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *S. aureus* ATCC 6538 em biofilme de 24, 72 e 120 horas.

DESINFETANTES	log UFC/cm ² (média ± desvio padrão)		
	24h	72h	120h
Ácido iodado ^b	0,88 ± 1,13 (3) ^a	0,98 ± 0,95 (3) ^a	2,45 ± 1,12 (3) ^a
Biguanida ^c	3,64 ± 0,24 (3) ^a	3,55 ± 0,06 (3) ^a	3,30 ± 1,24 (3) ^a
Quaternário de amônio ^c	2,54 ± 2,08 (3) ^a	2,56 ± 0,20 (3) ^a	2,83 ± 2,48 (3) ^a
Ácido peracético ^c	0,97 ± 1,42 (3) ^a	0,69 ± 0,09 (3) ^a	0,75 ± 0,74 (3) ^a
Clorado ^d	0,26 ± 0,45 (3) ^a	0,43 ± 0,75 (3) ^a	0,16 ± 0,28 (3) ^a
Controles positivos ^e	6,40 ± 0,26 (3) ^a	6,09 ± 0,58 (3) ^a	5,88 ± 0,76 (3) ^a

LEGENDA:

^a O número em parênteses (3) indica o número de experimentos realizados - triplicata.

^b Concentração de 0,20%

^c Concentração de 0,50%

^d Concentração de 1,50%

^e Controles positivos: Biofilme de *S. aureus* não submetido ao efeito de desinfetantes.

A relação da idade do biofilme de *S. aureus* com a ação dos desinfetantes estudados não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,689$), isto é, a contagem do número de células viáveis expressa em log UFC/cm² dos biofilmes não foi influenciada pela interação dos fatores: ação dos desinfetantes e idade do biofilme em horas. A figura 7 mostra estes resultados.

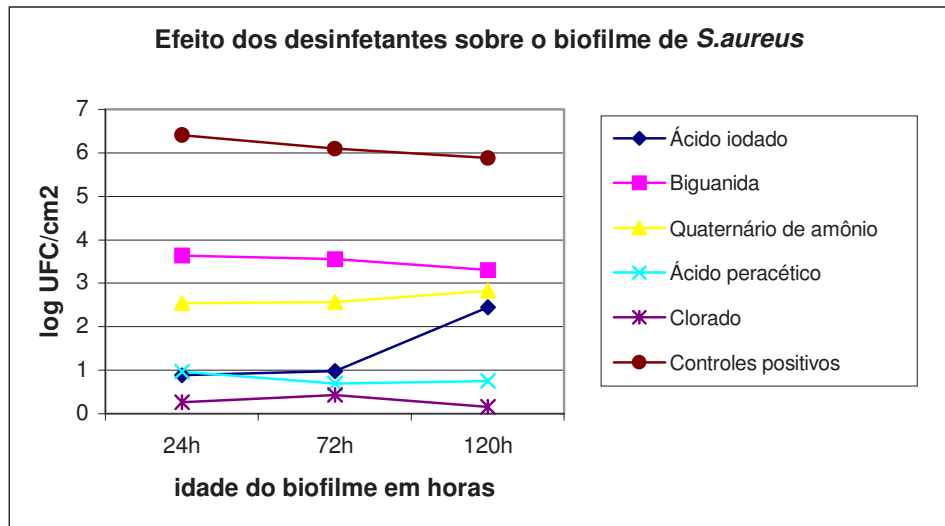


Figura 7. Influência da ação dos desinfetantes sobre os biofilmes de *S. aureus*.

O *S. aureus* em suspensão (células planctônicas) não apresentou células viáveis após o tratamento com cada um dos desinfetantes estudados, como mostra a tabela 2.

TABELA 2. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *S. aureus* ATCC 6538 em suspensão (células planctônicas).

DESINFETANTES	<u>log UFC/ml (média ± desvio padrão)</u>
Ácido iodado ^b	0 ± 0 (3) ^a
Biguanida ^c	0 ± 0 (3) ^a
Quaternário de amônio ^c	0 ± 0 (3) ^a
Ácido peracético ^c	0 ± 0 (3) ^a
Clorado ^d	0 ± 0 (3) ^a
Controles positivos ^e	5,40 ± 0,14 (3) ^a

LEGENDA:

^a O número em parênteses (3) indica o número de experimentos realizados - triplicata.

^b Concentração de 0,20%

^c Concentração de 0,50%

^d Concentração de 1,50%

^e Controles positivos: Suspensão de *S. aureus* não submetido ao efeito de desinfetantes.

Os resultados apresentados na tabela 1 quando comparados com os resultados da tabela 2 mostram que células de *S. aureus*, quando em biofilme formado sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, são mais resistentes à ação dos agentes desinfetantes testados quando comparado com suas células em suspensão.

4.1.2 *E. coli* ATCC 25922

As médias da quantificação do número de células viáveis de *E. coli* em biofilme de 24, 72 e 120 horas após o tratamento com os desinfetantes estudados estão apresentadas na tabela 3. Diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,000$) foram observadas após o tratamento das células microbianas com os desinfetantes. Isso significa que a ação dos desinfetantes teve influência na contagem do número de células viáveis de *E. coli*. Comparando com o controle positivo, observamos que o desinfetante clorado foi o mais eficaz na eliminação de células de *E. coli*, ou seja, baixos números de células viáveis expressos em logaritmos de unidades formadoras de colônias por cm^2 ($\log \text{UFC}/ \text{cm}^2$) foram obtidos após o tratamento com este desinfetante. Após o tratamento com o desinfetante ácido iodado, as células de *E. coli* também apresentaram baixos números de células viáveis, sendo o segundo desinfetante mais eficaz na eliminação das células de *E. coli* em biofilme. O desinfetante à base de biguanida mostrou ser o menos eficaz na eliminação das células de *E. coli*, seguido dos desinfetantes à base de quaternário de amônio e ácido peracético. Estes resultados foram confirmados estatisticamente por meio do teste de comparação múltipla de Tukey.

TABELA 3. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *E. coli* ATCC 25922 em biofilme de 24, 72 e 120 horas.

DESINFETANTES	log UFC/cm ² (média ± desvio padrão)		
	24h	72h	120h
Ácido iodado ^b	1,70 ± 0,95 (3) ^a	0,10 ± 0,17 (3) ^a	0,83 ± 1,18 (3) ^a
Biguanida ^c	1,42 ± 0,82 (3) ^a	1,83 ± 0,02 (3) ^a	2,24 ± 0,51 (3) ^a
Quaternário de amônio ^c	0,88 ± 0,93 (3) ^a	2,45 ± 0,13 (3) ^a	1,73 ± 0,55 (3) ^a
Ácido peracético ^c	0,36 ± 0,32 (3) ^a	1,60 ± 0,06 (3) ^a	2,14 ± 0,33 (3) ^a
Clorado ^d	0,26 ± 0,24 (3) ^a	0 ± 0 (3) ^a	0,30 ± 0,30 (3) ^a
Controles positivos ^e	5,31 ± 0,23 (3) ^a	4,37 ± 0,45 (3) ^a	4,71 ± 0,42 (3) ^a

LEGENDA:

^a O número em parênteses (3) indica o número de experimentos realizados - triplicata.

^b Concentração de 0,20%

^c Concentração de 0,50%

^d Concentração de 1,50%

^e Controles positivos: Biofilme de *E. coli* não submetido ao efeito de desinfetantes.

A relação da idade do biofilme de *E. coli* com a ação dos desinfetantes estudados mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,003$), isto é, a contagem do número de células viáveis expressa em log UFC/ cm² dos biofilmes foi influenciada pela interação dos fatores: ação dos desinfetantes e idade do biofilme em horas. Contudo, a idade do biofilme mostrou não ser um fator influente na resistência das células aos desinfetantes. A figura 8 mostra estes resultados.

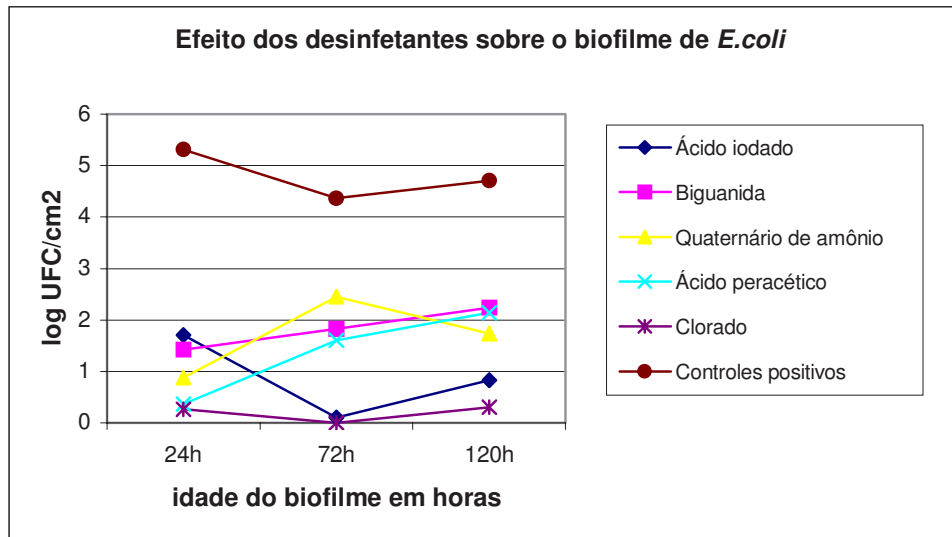


Figura 8. Influência da ação dos desinfetantes sobre os biofilmes de *E. coli*.

Em relação às células de *E. coli* em suspensão (células planctônicas), não houve viabilidade celular destas após o tratamento com os desinfetantes testados, como mostra a tabela 4.

TABELA 4. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *E. coli* ATCC 25922 em suspensão (células planctônicas).

DESINFETANTES	<u>log UFC/ml (média ± desvio padrão)</u>
Ácido iodado ^b	0 ± 0 (3) ^a
Biguanida ^c	0 ± 0 (3) ^a
Quaternário de amônio ^c	0 ± 0 (3) ^a
Ácido peracético ^c	0 ± 0 (3) ^a
Clorado ^d	0 ± 0 (3) ^a
Controles positivos ^e	5,58 ± 0, 16 (3) ^a

LEGENDA:

^a O número em parênteses (3) indica o número de experimentos realizados - triplicata.

^b Concentração de 0,20%

^c Concentração de 0,50%

^d Concentração de 1,50%

^e Controles positivos: Suspensão de *E. coli* não submetido ao efeito de desinfetantes.

Os resultados apresentados na tabela 3 quando comparados com os resultados da tabela 4 mostram que células de *E. coli* quando em biofilme formado sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, são mais resistentes à ação dos agentes desinfetantes testados quando comparadas com suas células em suspensão.

4.1.3 *L. monocytogenes* ATCC 7644

As médias da quantificação do número de células viáveis de *L. monocytogenes* em biofilme de 24, 72 e 120 horas após o tratamento com os desinfetantes estudados estão apresentadas na tabela 5. Diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,000$) foram observadas após o tratamento das células microbianas com os desinfetantes. Isso significa que a ação dos desinfetantes teve influência na contagem do número de células viáveis de *L. monocytogenes*. Comparando com o controle positivo, observamos que o desinfetante clorado foi o mais eficaz na eliminação de células de *L. monocytogenes*, ou seja, baixos números de células viáveis expressos em logaritmos de unidades formadoras de colônias por cm^2 ($\log \text{UFC}/ \text{cm}^2$) foram obtidos após o tratamento com este desinfetante. Posteriormente ao tratamento com o desinfetante à base de ácido peracético, as células de *L. monocytogenes* também apresentaram baixos números de células viáveis, sendo o segundo desinfetante mais eficaz na eliminação das células de *L. monocytogenes* em biofilme. O desinfetante à base de biguanida mostrou ser o menos eficaz na eliminação das células de *L. monocytogenes*, seguido dos desinfetantes ácido iodado e à base de quaternário de amônio. Estes resultados foram confirmados estatisticamente por meio do teste de comparação múltipla de Tukey.

TABELA 5. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 em biofilme de 24, 72 e 120 horas.

DESINFETANTES	log UFC/cm ² (média ± desvio padrão)		
	24h	72h	120h
Ácido iodado ^b	2,45 ± 0,10 (3) ^a	1,26 ± 0,85 (3) ^a	1,96 ± 0,03 (3) ^a
Biguanida ^c	1,93 ± 0,48 (3) ^a	2,27 ± 0,09 (3) ^a	2,91 ± 0,84 (3) ^a
Quaternário de amônio ^c	2,01 ± 0,03 (3) ^a	1,54 ± 0,24 (3) ^a	1,39 ± 0,43 (3) ^a
Ácido peracético ^c	1,65 ± 0,04 (3) ^a	1,26 ± 0,84 (3) ^a	1,13 ± 0,10 (3) ^a
Clorado ^d	1,17 ± 0,02 (3) ^a	0,26 ± 0,24 (3) ^a	1,04 ± 0,03 (3) ^a
Controles positivos ^e	6,65 ± 0,05 (3) ^a	6,83 ± 0,58 (3) ^a	6,28 ± 0,62 (3) ^a

LEGENDA:

^a O número em parênteses (3) indica o número de experimentos realizados - triplicata.

^b Concentração de 0,20%

^c Concentração de 0,50%

^d Concentração de 1,50%

^e Controles positivos: Biofilme de *L. monocytogenes* não submetido ao efeito de desinfetantes.

A relação da idade do biofilme de *L. monocytogenes* com a ação dos desinfetantes estudados mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,002$), isto é, a contagem do número de células viáveis expressa em log UFC/cm² dos biofilmes foi influenciada pela interação dos fatores: ação dos desinfetantes e idade do biofilme em horas. Contudo, a idade do biofilme mostrou não ser um fator influente na resistência das células aos desinfetantes. A figura 9 mostra estes resultados.

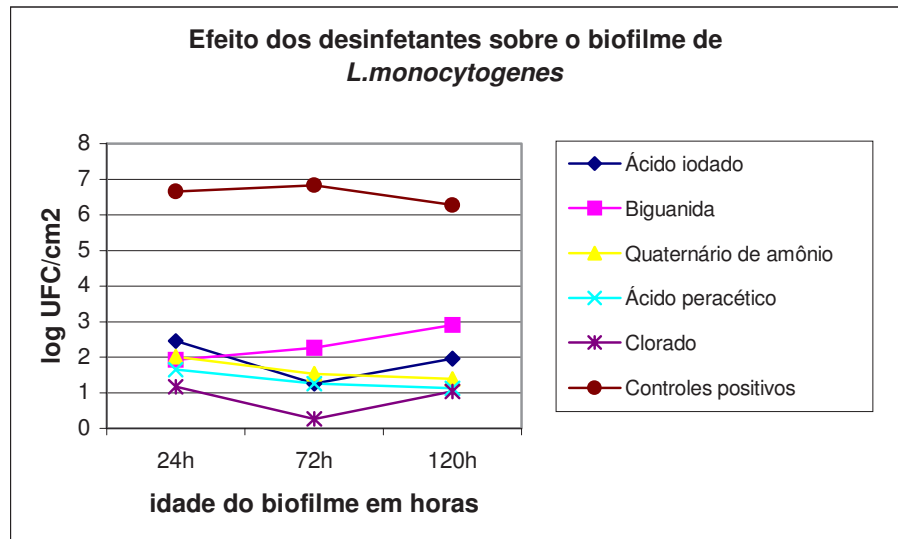


Figura 9. Influência da ação dos desinfetantes sobre os biofilmes de *L. monocytogenes*.

Em relação às células de *L. monocytogenes* em suspensão (células planctônicas), não houve viabilidade celular destas após o tratamento com os desinfetantes testados, como mostra a tabela 6.

TABELA 6. Efeito dos desinfetantes após 10 minutos de ação sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 em suspensão (células planctônicas).

DESINFETANTES	<u>log UFC/ml (média ± desvio padrão)</u>
Ácido iodado ^b	0 ± 0 (3) ^a
Biguanida ^c	0 ± 0 (3) ^a
Quaternário de amônio ^c	0 ± 0 (3) ^a
Ácido peracético ^c	0 ± 0 (3) ^a
Clorado ^d	0 ± 0 (3) ^a
Controles positivos ^e	5,63 ± 0, 13 (3) ^a

LEGENDA:

^a O número em parênteses (3) indica o número de experimentos realizados - triplicata.

^b Concentração de 0,20%

^c Concentração de 0,50%

^d Concentração de 1,50%

^e Controles positivos: Suspensão de *L. monocytogenes* não submetido ao efeito de desinfetantes.

Os resultados apresentados na tabela 5 quando comparados com os resultados da tabela 6 mostram que células de *L. monocytogenes*, quando em biofilme formado sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, são mais resistentes à ação dos agentes desinfetantes testados quando comparadas com suas células em suspensão.

4.2. ANÁLISES POR MEIO DE MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA DA MORFOLOGIA DOS BIOFILMES FORMADOS SOBRE A SUPERFÍCIE DO AÇO INOXIDÁVEL AISI 304 ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM OS DESINFETANTES

4.2.1 BIOFILME DE *S. aureus* ATCC 6538

Os resultados das características morfológicas dos biofilmes de *S. aureus* formados sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304 e visualizados por eletromicrografias estão apresentados nas figuras 11 a 16.

A figura 10 mostra a superfície do aço inoxidável AISI 304 sem a aderência e formação de biofilme microbiano, visualizado por eletromicrografia, utilizado como um controle negativo em todas as análises realizadas por meio de microscópio eletrônico de varredura.

A figura 11 mostra a superfície do aço inoxidável AISI 304 com o biofilme de *S. aureus* formado em 120 horas, visualizado por eletromicrografia, e não submetido ao tratamento com nenhum desinfetante, sendo utilizado como um controle positivo.

As figuras 12 a 16 mostram os biofilmes de *S. aureus* formados em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, e visualizados por eletromicrografia após o tratamento de 10 minutos com os desinfetantes: ácido iodado 0,20% (figura 12), à base de biguanida 0,50% (figura 13), à base de quaternário de amônio 0,50% (figura 14), à base de ácido peracético 0,50% (figura 15) e clorado 1,50% (figura 16).

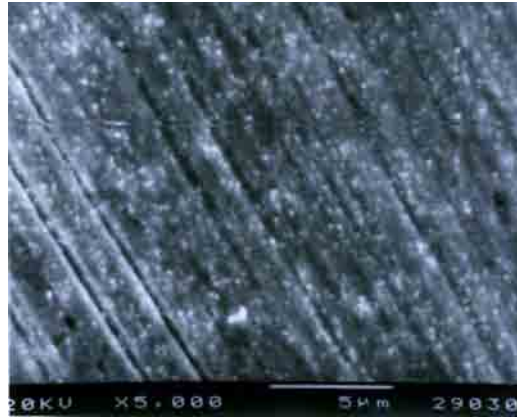


FIGURA 10. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando o controle negativo - superfície do aço inoxidável AISI 304 com ausência de microrganismos aderidos (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).



FIGURA 11. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando o controle positivo - superfície do aço inoxidável AISI 304 evidenciando células de *S. aureus* aderidas formando biofilme de 120 horas, sem tratamento com desinfetantes (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).



FIGURA 12. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *S. aureus* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante ácido iodado 0,20% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).



FIGURA 13. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *S. aureus* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante á base de biguanida 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

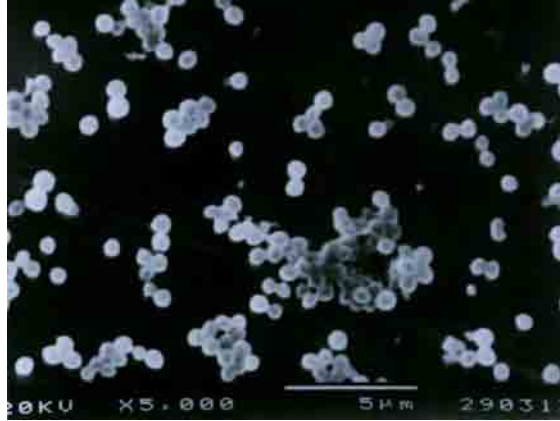


FIGURA 14. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *S. aureus* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de quaternário de amônio 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).



FIGURA 15. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando poucas células de *S. aureus* aderidas à superfície, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de ácido peracético 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).



FIGURA 16. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando uma única célula de *S. aureus* aderida à superfície após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante clorado 1,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

4.2.2 BIOFILME DE *E. coli* ATCC 25922

Os resultados das características morfológicas dos biofilmes de *E. coli* formados sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304 e visualizados por eletromicrografias estão apresentados nas figuras 17 a 22.

A figura 17 mostra a superfície do aço inoxidável AISI 304 com o biofilme de *E. coli* formado em 120 horas, visualizado por eletromicrografia, e não submetido ao tratamento com nenhum dos desinfetantes estudados, sendo utilizado como um controle positivo nas análises.

As figuras 18 a 22 mostram os biofilmes de *E. coli* formados em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, e visualizados por eletromicrografia após o tratamento de 10 minutos com os desinfetantes: ácido iodado 0,20% (figura 18), à base de biguanida 0,50% (figura 19), à base de quaternário de amônio 0,50% (figura 20), à base de ácido peracético 0,50% (figura 21) e clorado 1,50% (figura 22).

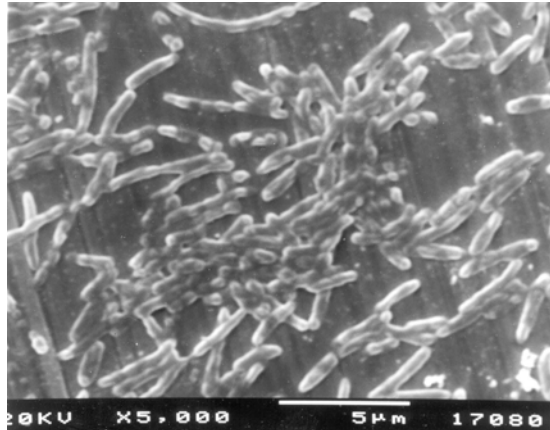


FIGURA 17. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando o controle positivo - superfície do aço inoxidável AISI 304 mostrando células de *E. coli* aderidas formando biofilme de 120 horas, sem tratamento com desinfetantes (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

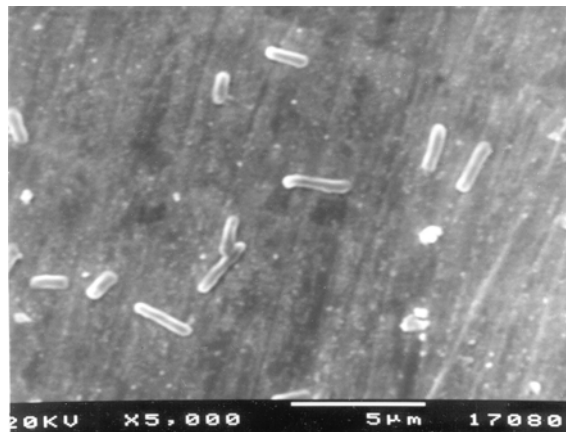


FIGURA 18. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando células de *E. coli* aderidas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante ácido iodado 0,20% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

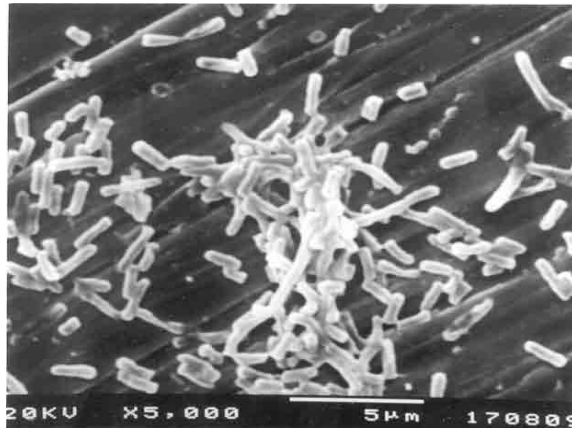


FIGURA 19. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *E. coli* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de biguanida 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

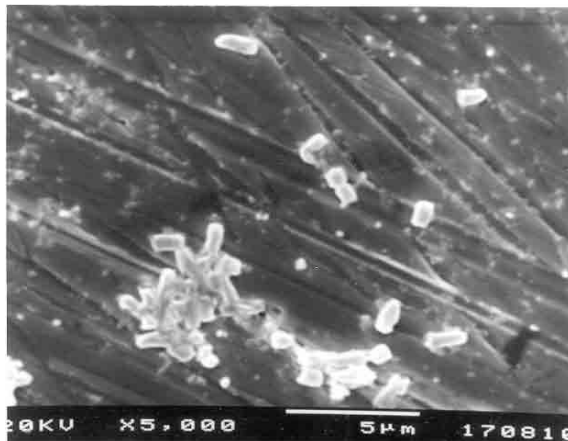


FIGURA 20. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *E. coli* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de quaternário de amônio 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

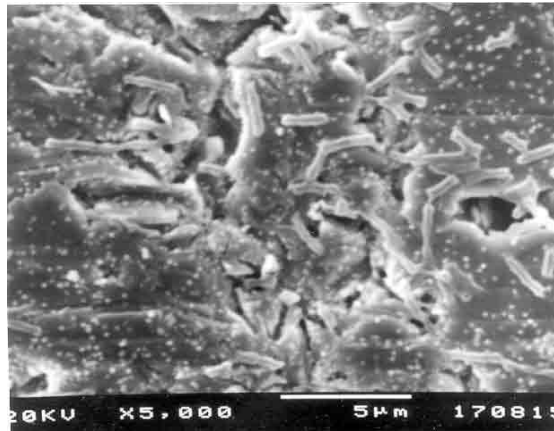


FIGURA 21. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *E. coli* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de ácido peracético 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

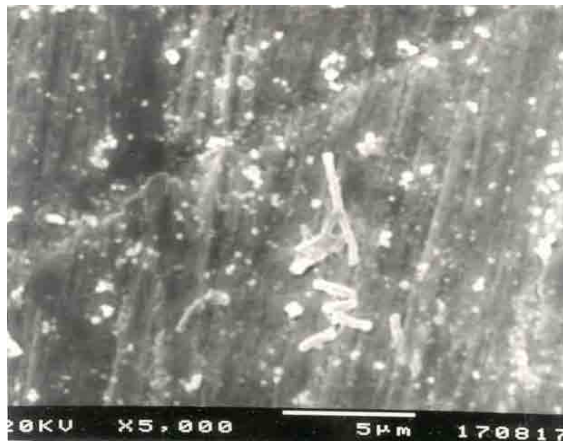


FIGURA 22. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando poucas células de *E. coli* aderidas à superfície após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante clorado 1,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

4.2.3 BIOFILME DE *L. monocytogenes* ATCC 7644

Os resultados das características morfológicas dos biofilmes de *L. monocytogenes* formado sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304 e visualizados por eletromicrografias estão apresentados nas figuras 23 a 28.

A figura 23 mostra a superfície do aço inoxidável AISI 304 com o biofilme de *L. monocytogenes* formado em 120 horas, visualizado por eletromicrografia, e sem ser submetido ao tratamento com nenhum desinfetante, sendo utilizado como um controle positivo nas análises.

As figuras 24 a 28 mostram os biofilmes de *L. monocytogenes* formados em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, e visualizados por eletromicrografia após o tratamento de 10 minutos com os desinfetantes: ácido iodado 0,20% (figura 24), à base de biguanida 0,50% (figura 25), à base de quaternário de amônio 0,50% (figura 26), à base de ácido peracético 0,50% (figura 27) e clorado 1,50% (figura 28).

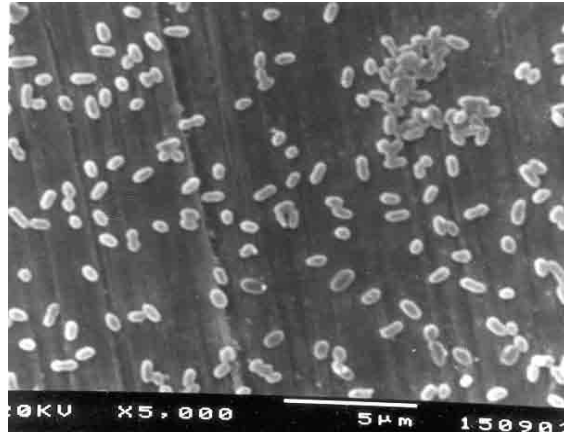


FIGURA 23. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando o controle positivo - superfície do aço inoxidável AISI 304 mostrando células de *L. monocytogenes* aderidas formando biofilme de 120 horas, sem tratamento com desinfetantes (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

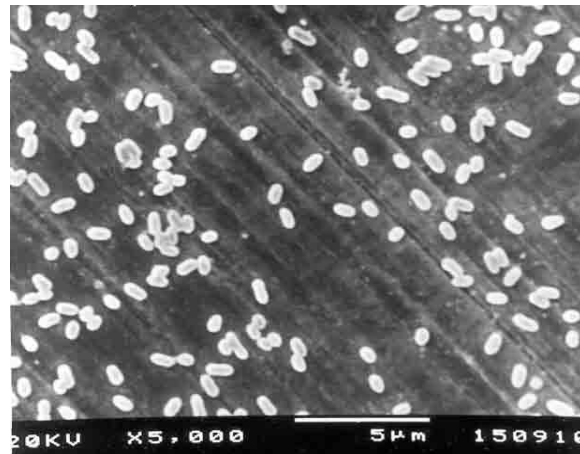


FIGURA 24. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando células de *L. monocytogenes* aderidas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante ácido iodado 0,20% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

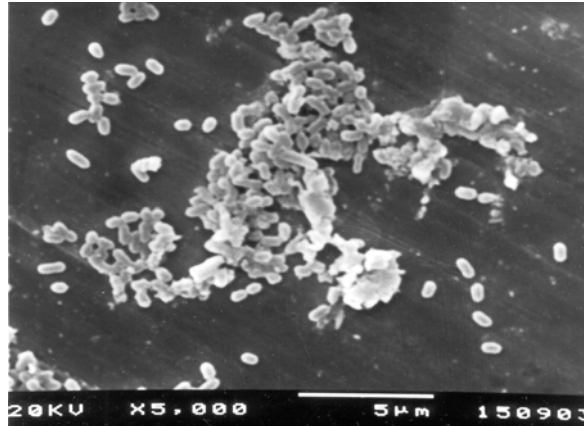


FIGURA 25. Eletromicrografia de varredura (5000x) do biofilme de *L. monocytogenes* formado em 120 horas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de biguanida 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

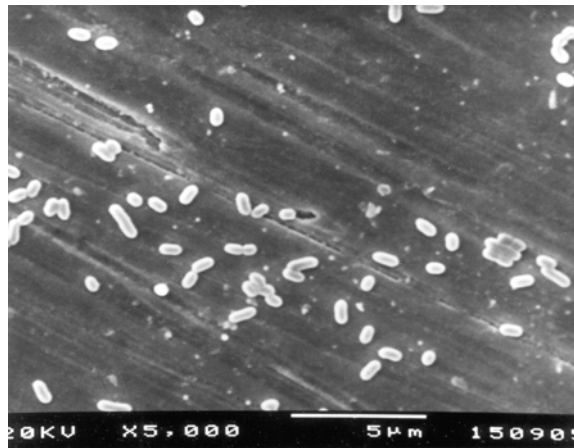


FIGURA 26. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando células de *L. monocytogenes* aderidas sobre a superfície do aço inoxidável AISI 304, após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de quaternário de amônio 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

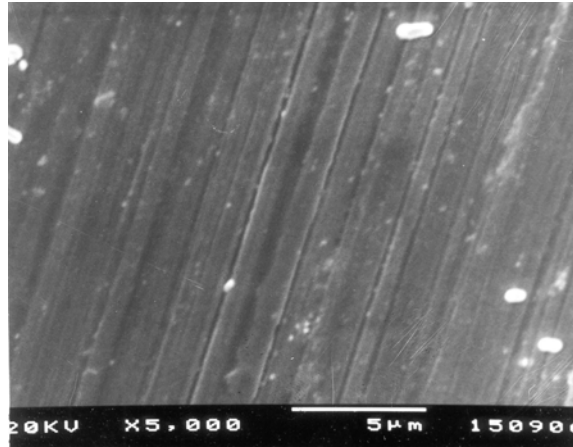


FIGURA 27. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando poucas células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante à base de ácido peracético 0,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

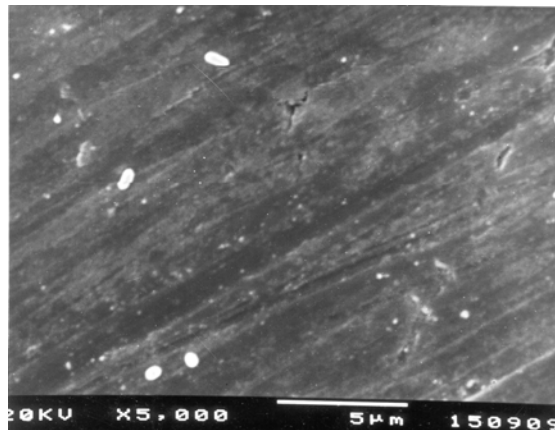


FIGURA 28. Eletromicrografia de varredura (5000x) mostrando poucas células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície após o tratamento de 10 minutos com o desinfetante clorado 1,50% (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

5. DISCUSSÃO

Na presente pesquisa estudou-se a suscetibilidade dos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, em suspensão e em biofilme artificial, frente à ação de desinfetantes utilizados por indústrias alimentícias. As cepas citadas foram selecionadas para o estudo por representarem microrganismos que são freqüentemente envolvidos em contaminações de alimentos processados (TAUXE, 1997; MEADS et al., 1999).

A suscetibilidade dos microrganismos à ação dos desinfetantes foi avaliada por meio de técnica bacteriológica de viabilidade celular e microscopia eletrônica de varredura.

Existem muitas técnicas avançadas disponíveis para observar a formação do biofilme sobre as superfícies, contudo, neste trabalho, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura devido à sua disponibilidade e por ser uma técnica amplamente utilizada em pesquisas sobre biofilme, além de fornecer bons resultados topográficos (PIZZOLITTO, 1997; COSTERTON, 1999; DONLAN, 2002).

A avaliação quantitativa do crescimento bacteriano pode ser realizada pelas seguintes técnicas bacteriológicas: quantificação de forma direta, contando-se microscopicamente o número de células microbianas, quantificação de forma indireta, efetuando-se análise da turbidez e determinação do peso seco ou através da contagem do número de microrganismos viáveis (viabilidade celular), utilizando um meio de cultura apropriado. Esta última foi a técnica escolhida para ser usada em nossa pesquisa devido a vantagem de somente as células viáveis serem contadas e pela possibilidade de isolamento de colônias para eventuais estudos (CARDOSO, 2000).

É bem documentado que as bactérias podem aderir a uma variedade de superfícies presentes no ambiente de indústrias processadoras de alimentos, como as superfícies de aço inoxidável AISI 304, comumente o material mais utilizado em plantas e instalações industriais. Uma vez aderidas, as bactérias podem formar um biofilme microbiano, que apresenta a característica de difícil remoção de superfícies constituindo, assim, uma fonte potencial de contaminação dos alimentos com microrganismos patogênicos e deterioradores (HOOD e ZOTTOLA, 1995).

Uma das primeiras pesquisas de aderência bacteriana à superfícies que entram em contato com alimentos foi realizada por Zoltai et al (1981). Estes pesquisadores usaram um microscópio eletrônico de varredura para mostrar a aderência de *Pseudomonas fragi* e *Staphylococcus aureus* à superfícies de aço inoxidável e vidro.

Enquanto esse estudo somente demonstrou visualmente que microrganismos estavam sobre a superfície, outros pesquisadores buscaram estudar a eficácia de agentes desinfetantes na eliminação de tais microrganismos aderidos (DE BEER et al., 1994; GIBSON et al, 1999; MIYANO et al, 2003; AUGUSTIN et al., 2004).

Na presente pesquisa, os desinfetantes ácido iodado, à base de biguanida, à base de quaternário de amônio, à base de ácido peracético e clorado, foram utilizados para estudar a suscetibilidade dos microrganismos por constituírem os principais agentes desinfetantes usados por indústrias alimentícias brasileiras e por serem autorizados pelo Ministério da Saúde para o uso em tais indústrias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

Os compostos clorados são comumente aplicados como desinfetantes devido ao seu poder oxidante, sendo usados efetivamente na desinfecção de

equipamentos de processamento de alimentos, recipientes e utensílios, e em água de resfriamento de alimentos enlatados. Para a realização da desinfecção de equipamentos, soluções de 100-200 ppm de hipoclorito usualmente são mantidas em circulação através dos equipamentos por dez minutos. Na pulverização sob alta pressão em tanques abertos ou fechados, usa-se cerca de 200 ppm de cloro (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003; JOHNSON DIVERSEY – INFORME TÉCNICO M.S Nº 3.2661.0146).

Os resultados obtidos na presente pesquisa mostraram que o desinfetante clorado foi o mais eficaz na eliminação das células microbianas em biofilme quando comparado com os outros desinfetantes testados (ácido iodado, à base de biguanida, à base de quaternário de amônio e à base de ácido peracético). Contudo, o desinfetante clorado não foi capaz de eliminar completamente as células em biofilme, permitindo a retenção de células à superfície do aço inoxidável após o tratamento químico. Nossos resultados são concordantes com os de outras pesquisas (SCHWACH e ZOTTOLA, 1984; RONNER e WONG, 1993; DE BEER et al., 1994; SAMRAKANDI et al., 1997).

Schwach e Zottola (1984) usaram um microscópio eletrônico de varredura para mostrar que microrganismos não foram completamente removidos da superfície do aço inoxidável após uma rinsagem com hipoclorito de sódio 150 ppm. Entretanto, estes pesquisadores não determinaram a viabilidade das células remanescentes após serem submetidas ao tratamento químico.

De Beer et al (1994) notaram que o cloro não pôde penetrar completamente em um biofilme misto de *Pseudomonas* e *Klebsiella* depois de uma hora de exposição.

Ronner e Wong (1993) mostraram que o cloro e os desinfetantes aniônicos foram mais capazes de remover *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. de superfícies de aço inoxidável do que os compostos quaternários de amônio.

Samrakandi et al (1997) mostraram que o desinfetante à base de monocloramina foi melhor capaz de penetrar em um biofilme bacteriano do que o cloro. Mas a monocloramina requer um longo tempo de contato para ser eficaz.

O iodo possui propriedades oxidantes e tem sido aplicado como desinfetante há mais de um século nas formas de tintura de iodo, solução de iodo alcoólico e soluções contendo iodo metálico mais iodeto. No entanto, nestas formas, o iodo apresenta restrições em sua utilização devido à baixa ação de molhagem que apresenta excessiva pressão de vapor, problemas com solubilidade, irritação à pele, olhos e mucosas de manipuladores. Por isso, o uso do iodo como agente de desinfecção nas indústrias de alimentos tornou-se muito mais viável com formulações conhecidas como iodóforos, caracterizados por complexos que liberam lentamente o iodo, apresentam uma melhor solubilidade, são inodoros e não são irritantes à pele (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003; JOHNSON DIVERSEY – INFORME TÉCNICO M.S Nº 3.0034.0619).

Alguns desinfetantes resultam da combinação do ácido com o iodo, tornando o desinfetante mais eficiente devido à maior presença de I_2 liberado por causa do baixo pH (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

Na presente pesquisa, o desinfetante à base de iodo (ácido iodado) foi o segundo desinfetante mais eficaz na eliminação das células de *E. coli* em biofilme quando comparado com os outros desinfetantes testados. Porém, este mesmo

desinfetante foi o segundo menos eficaz na eliminação das células de *L. monocytogenes* em biofilme. Quanto à eliminação das células de *S. aureus* em biofilme, o desinfetante ácido iodado apresentou uma eficácia intermediária entre o mais e o menos eficaz entre os desinfetantes testados. Nossos resultados coincidem com os de Pyle e Mc Feters (1989) os quais demonstraram que a suscetibilidade de bactérias ao iodo é altamente variável, dependendo do microrganismo, bem como das suas condições de crescimento microbiano.

Os compostos quaternários de amônio são desinfetantes surfactantes catiônicos, efetivos contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. São indicados na desinfecção de equipamentos abertos, peças, utensílios e superfícies de frigoríficos, abatedouros avícolas, laticínios, indústrias de pescado, alimentícias e de bebidas em geral. Possuem as características de serem não corrosivos, com baixa toxicidade, não irritando a pele de manipuladores, e sua atividade não é afetada por resíduos orgânicos (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003; JOHNSON DIVERSEY – INFORME TÉCNICO M.S Nº 3.0034.0410).

Mc Carthy (1992) demonstrou que 400 ppm de quaternário de amônio por um tempo de 5 minutos foi requerido para inativar um biofilme de *Listeria monocytogenes*, enquanto um trabalho de Frank e Koffi (1990) mostrou que um biofilme de *L. monocytogenes* tratado com 800 ppm de quaternário de amônio por 20 minutos não foi inativado completamente.

Trachoo e Frank (2002) mostraram que em uma inativação experimental de biofilme de *Campylobacter jejuni*, compostos quaternários de amônio, ácido peracético e uma mistura de ácido peracético e ácido peroctanóico não puderam eliminar o biofilme depois do tratamento de 50 e 200 ppm por 45 segundos.

Similarmente aos resultados de Frank e Koffi (1990) e Trachoo e Frank (2002), os resultados da presente pesquisa mostraram que o desinfetante à base de quaternário de amônio não foi capaz de eliminar completamente as células microbianas em biofilme, sendo o segundo desinfetantes menos eficaz na eliminação das células de *S. aureus* e *E. coli* em biofilme quando comparado com os outros desinfetantes testados.

O desinfetante à base de ácido peracético é um potente biocida, eficaz contra fungos filamentosos, leveduriformes e bactérias gram-negativas e gram-positivas e esporos, agindo através de oxidação do material celular. Este desinfetante pode ser usado na desinfecção de tanques, carbonatadores, trocadores de calor, enchedoras, tubulações, equipamentos processadores de carnes e salas frias de indústrias alimentícias e de bebidas em geral. É, freqüentemente, usado em desinfecções frias por causa de sua atividade em baixas temperaturas (JOHNSON DIVERSEY – INFORME TÉCNICO M.S Nº 3.2661.0161).

Harkonen et al (1999) mostraram que o desinfetante à base de ácido peracético foi mais eficaz contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em biofilme do que o desinfetante hipoclorito. Contudo, este estudo demonstrou que *Listeria innocua* apresentou resistência ao ácido peracético.

Fatemi e Frank (1999) determinaram a eficácia de vários desinfetantes sobre biofilmes de *Listeria* spp. e *Pseudomonas* spp. aderidos sobre a superfície de aço inoxidável na presença de resíduos de leite. Eles mostraram que o ácido peracético foi mais eficaz do que o cloro na inativação dos biofilmes.

Richards (1999) e Makela et al (1991) mostraram que o ácido peracético e compostos quaternários de amônio foram mais eficazes na inativação de um biofilme de *Listeria* em plantas de um laticínio do que o desinfetante hipoclorito.

Todavia, Rossoni e Gaylarde (2000) mostraram que o hipoclorito foi mais eficaz na inativação de uma cultura mista de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* aderida à superfície do aço inoxidável do que o ácido peracético.

Pode ser difícil comparar os resultados desses estudos devido à grande variedade nas condições para a aderência e desenvolvimento do biofilme, onde essas diferenças podem ser significativas (HOOD e ZOTTOLA, 1995).

Em geral, o ácido peracético tem mostrado ser efetivo contra bactérias em biofilme, sendo vantajoso no uso de biofilmes contendo resíduos de alimentos (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

Os resultados obtidos na presente pesquisa não foram diferentes dos resultados de Rossoni e Gaylarde (2000), nos quais o desinfetante à base de ácido peracético foi eficaz na eliminação das células em biofilme, porém, o desinfetante clorado apresentou maior eficácia.

O desinfetante à base de biguanida tem sido recomendado como agente desinfetante em indústrias alimentícias, sendo utilizado em equipamentos, utensílios, no controle microbiológico de salmoras e em diferentes tipos de superfícies encontradas em frigoríficos, abatedouros avícolas, laticínios e indústrias de pescados. O mecanismo de ação da biguanida caracteriza-se pela rápida absorção pelas células bacterianas, resultando em diversas modificações citológicas que afetam a permeabilidade celular (JOHNSON DIVERSEY – INFORME TÉCNICO M.S Nº 3.0034.0561).

Os resultados obtidos na presente pesquisa mostraram que o desinfetante à base de biguanida foi o menos eficaz na eliminação das células de *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* em biofilme quando comparado com os outros desinfetantes testados. Após o tratamento com a biguanida, notou-se altos valores na contagem de células viáveis remanescentes, bem como uma grande quantidade de células aderidas à superfície do aço inoxidável, observadas por microscópio eletrônico de varredura.

No presente estudo, além de avaliar a suscetibilidade de microrganismos aderidos frente ao tratamento com agentes antimicrobianos químicos (desinfetantes), foi realizada uma avaliação comparativa das células aderidas com as células dos microrganismos em suspensão (células planctônicas) quanto à suscetibilidade aos desinfetantes.

Os nossos resultados coincidem com os de outros pesquisadores que sugerem que as práticas de desinfecção são menos efetivas em microrganismos aderidos quando comparadas com microrganismos em suspensão.

LeChevalier et al (1988) demonstraram que um biofilme bacteriano pode ser 150-3000 vezes mais resistente ao cloro livre e 2-100 vezes mais resistente à monocloramina do que as bactérias em suspensão.

Frank e Koffi (1990) mostraram que um biofilme composto de *L. monocytogenes* formado sobre uma superfície de vidro sobreviveu dez vezes mais do que as células de *L. monocytogenes* em suspensão quando expostas a desinfetantes ácidos aniônicos.

Knowles e Roller (2001) estudaram a eficácia de biocidas comerciais contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella entérica* e *Saccharomyces cerevisiae*

em biofilme formado sobre o aço inoxidável e em suspensão. Estes pesquisadores concluíram que as bactérias em suspensão foram mais sensíveis aos biocidas do que as bactérias em biofilme.

O desenvolvimento de resistência à biocidas não é ainda entendido, mas estudos recentes têm usado uma variedade de modelos para determinar como e por que os biofilmes são tão resistentes a agentes antimicrobianos (MAH e O'TOOLE, 2001).

Alguns fatores parecem estar relacionados com a resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos, dentre eles: a produção de substância polimérica extracelular pelas próprias células em biofilme, que preveniria a penetração dos agentes antimicrobianos no biofilme, a diminuição da taxa de crescimento dos organismos em biofilme, a heterogeneidade do biofilme, o mecanismo de *Quorum sensing* e a indução da expressão de alguns genes (MAH e O'TOOLE, 2001; CAMPANAC et al., 2002; AUGUSTIN et al., 2004).

Uma diferença entre biofilmes espessos e delgados e suas resistência a antimicrobianos tem sido observada (MAH e O'TOOLE, 2001).

Stewart et al (2000) notaram que biofilmes espessos (densidade celular média de aproximadamente $7,6 \log \text{ UFC/cm}^2$) formados sobre uma superfície de vidro apresentaram uma barreira para a penetração do peróxido de hidrogênio. Interessantemente, o peróxido de hidrogênio foi capaz de penetrar em um biofilme espesso formado por cepas mutantes de *P. aeruginosa* ausentes de um dos principais genes da catalase, o *KatA*. Como as catalases são enzimas que neutralizam o peróxido

de hidrogênio, este resultado sugere que, em biofilmes espessos, as células podem ser protegidas da penetração de certos biocidas pela presença da enzima catalase.

LeChevalier et al (1988) estudaram os fatores que promovem a sobrevivência de bactérias em suplementos de água clorada. Observaram que a idade do biofilme, encapsulamento bacteriano e condições de crescimento (crescimento médio e temperatura) aumentam a resistência das células em biofilme ao cloro.

Os resultados desse estudo não coincidem com os resultados da nossa pesquisa, na qual foi observada uma grande variação na contagem do número de células viáveis de biofilmes de 24, 72 e 120 horas, após o tratamento com os desinfetantes estudados, mostrando que a idade do biofilme em horas não foi um fator influente no aumento da resistência das células em biofilme.

A variação na quantificação das células viáveis obtida nos resultados da presente pesquisa pode estar relacionada ao fenômeno de “desprendimento” do biofilme microbiano.

O desprendimento ocorre em biofilmes maduros que, por serem espessos, proporcionam um ambiente anaeróbico em seu interior. Por sua vez, o ambiente anaeróbico provoca um aumento de ácidos e um acúmulo de gás insolúvel que enfraquece a estrutura do biofilme, causando um desprendimento de camadas de polímeros e levando a um destacamento de parte do biofilme maduro, fatos este que diminui a massa celular do biofilme. A porção destacada do biofilme pode se redepositar e se desenvolver em outros locais da superfície (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003; TRACHOO, 2003). Algumas pesquisas relacionam o fenômeno do desprendimento com a ação de enzimas que degradam a matriz de polímeros (COSTERTON, 1999; STOODLEY et al., 2002).

Outras pesquisas também observaram uma variação no crescimento das células microbianas em biofilme. Chae e Scharaft (2001) avaliaram o crescimento e a formação de biofilme de diferentes cepas de *L. monocytogenes* aderidas ao vidro em condições estáticas a 37° C por um período de 10 dias. Esses pesquisadores notaram que, em geral, ocorreu um ciclo de população celular e formação de biofilme. Houve um aumento inicial na população celular nos três primeiros dias e, então, o número de células e a produção de substâncias poliméricas extracelulares diminuíram. Depois do sexto dia, houve uma retomada na população celular e produção de biofilme.

Variações na resistência a agentes antimicrobianos têm sido observadas entre diferentes espécies de microrganismos. Alguns autores têm demonstrado que biofilmes de bactérias gram-negativas são mais resistentes do que outras espécies (AUGUSTIN et al., 2004). Esta característica pode ser devida as diferenças na composição da superfície celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-negativas possuem regiões polissacarídicas devido à presença do lipopolissacarídeo exposto em suas superfícies, tornando a superfície hidrofílica. As bactérias gram-positivas possuem porções lipídicas decorrente da presença de ácidos lipoteicóicos, tornando a superfície hidrofóbica (TRACHOO, 2003).

Na presente pesquisa, com as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* não foram encontradas relações entre espécies bacterianas e aumento na resistência aos desinfetantes.

Não há estudos que realmente comprovem as causas do desenvolvimento da resistência de células microbianas em biofilme a agentes antimicrobianos, incluindo os desinfetantes. Esta pesquisa chama a atenção para a necessidade de novos estudos em relação à remoção de biofilmes aderidos em

equipamentos e superfícies de indústrias alimentícias, utilizando-se técnicas moleculares para avaliar os mecanismos envolvidos no processo de resistência microbiana aos desinfetantes.

6. CONCLUSÕES

- 1- A superfície do aço inoxidável AISI 304 permitiu a formação de biofilme dos microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644;
- 2- O desinfetante clorado foi o mais eficaz na eliminação das células microbianas em biofilme após um contato de 10 minutos, enquanto que o desinfetante à base de biguanida foi o menos eficaz em um mesmo tempo de contato que o desinfetante clorado;
- 3- A idade do biofilme em horas (24, 72 e 120) demonstrou não ser um fator influente na resistência das células microbianas aos desinfetantes estudados;
- 4- As células microbianas em suspensão foram mais suscetíveis à ação dos desinfetantes do que as células microbianas associadas em biofilme.

7. REFERÊNCIAS

- AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. **J. Microbiol. Meth.**, v.30, p.141-152, 1997.
- AUGUSTIN, M.; ALI-VEHMAS, T.; ATROSHI, F. Assessment of enzymatic cleaning agents against bacterial biofilms. **J. Pharm. Sci.**, v.7, p.55-64, 2004.
- BERESFORD, M.R.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **J. Appl. Microbiol.**, v.90, p.1000-1005, 2001.
- BOS, R.; van der MEI, H.C.; GOLD, J.; BUSSCHER, H.J. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.189, p.311-315, 2000.
- CAMPANAC, C.; PINEAU, L.; PAYARD, A.; BAZIARD-MOUYSSET, G.; ROQUES, C. Interaction between biocide cationic agents and bacterial biofilms. **J. Antimicrob. Agents. Chem.**, v.46, p.1469-1474, 2002.
- CARDOSO, C.L. Microbiologia – Aulas práticas para o curso de medicina. Maringá: Apontamentos, 2000. 180p.
- CHAE, M.S.; SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food. Microbiol.**, v.18, p.103-112, 2001.
- CHARACHLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. **Biofilms**. New York: Wiley-Interscience, 1990. 796p.
- CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Inst. Food. Technol.**, v.2, p.22-32, 2003.
- COSTA, E.T.R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. Seropédica, RJ. 81p. Dissertação (Mestrado em microbiologia veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.
- COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.41, p. 435-464, 1987.
- COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. **Intern. J. Antimicrob. Agents**, v.11, p.217-221, 1999.

- DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P.S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, p.4339-4344, 1994.
- DONLAN, R.M. Role of biofilms in antimicrobial resistance. **ASAIO J.**, v.46, p.S47-S52, 2000.
- DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.881-890, 2002.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilm: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.15, p.167-193, 2002.
- DUNNE Jr., M.W. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin. Microbiol. Rev.**, v.15, p.155-166, 2002.
- EGINTON, P.J.; HOLAH, J.; ALLISON, D.G.; HANDLEY, P.S.; GILBERT, P. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. **Letters Appl. Microbiol.**, v.27, p.101-105, 1998.
- FATEMI, P.; FRANK, J.F. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracetic sanitizers. **J. Food. Prot.**, v.62, p.761-765, 1999.
- FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; FILHO, N.R. Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde. V.2. São Paulo: Atheneu, 2000. 1721p.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Food Code: 1997 recommendations of the United States Public Health Service. Washington, **United States Department of Health a Human Services**, 1997.
- FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: **Artmed**, 2002. 424p.
- FRANK, J.H.; KOFFI, R. A surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **J. Food. Protect.**, v.53, p.550-554, 1990.
- GÂNDARA, A.L.N.; OLIVEIRA, J.S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e feitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, v.20, p.1-14, 2000.
- GIBSON, H.; TAYLOR, J.H.; HALL, K.E.; HOLAH, J.T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **J. Appl. Microbiol.**, v.87, p.41-48, 1999.

HABASH, M.; REID, G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. **J. Clin. Pharmacol.**, v.39, p.887-898, 1999.

HARKONEN, P.; SALO, S.; MATTILA-SANHOLM, T.; WIRTANEN, G.; ALLISON, D.G.; GILBERT, P. Development of a simple *in vitro* test system for the disinfection of bacterial biofilm. **Wat. Sci. Technol.**, v. 39, p.219-225, 1999.

HERRMANN, P.S.P.; SILVA, M.A.P.; BERNARDES, R.; JOB, A.E.; COLNAGO, L.A.; FROMMER, J.E.; MATTOSO, L.H.C. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros.**, p.51-61, 1997.

HOLAH, J.T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance based surface disinfectant test for food hygiene. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 11, p.255-260, 1990.

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

ISTA, L.K.; PÉREZ-LUNA, V.H.; LÓPEZ, G.P. Surface-grafted, environmentally sensitive polymers for biofilm release. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.1603-1603, 1999.

KNOWLES, J.; ROLLER, S. Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. **J. Food. Prot.**, v.64, p.1542-1548, 2001.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **J. Food Microbiol.**, v.42 , p.9-27,1998.

LeCHEVALIER, M.W.; BABCOCK, T.M.; LEE, R.G. Examination and characterization of distribution system biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.2714-2724, 1987.

LeCHEVALIER, M.W.; CAWTHON, C.D.; LEE, R.G. Factor promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.54, p.649-654, 1988.

LUPPENS, S.B.I.; REIS, M.W.; VANDER HEIJDEN, R.W.L.; ROMBOUTS, F.M.; ABEE, T. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.4194-4200, 2002.

MAH, T.H.C.; O' TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v.9, p.34-38, 2001.

MAKELA, P.M.; KORKEALA, H.J.; SAND.E.K. Effectiveness of commercial germicide products against the ropy slime-producing lactic acid bacteria. **J. Food. Prot.**, v.54, p.632-636, 1991.

Mc CARTHY, S.A. Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and resistance to biocides. **Food. Technol.**, v.46, p.84-88, 1992.

MEADS, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, U.; Mc CAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, p.607-625, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Informativo técnico Divosan MH – Johnson Diversey Nº 3.0034.0619.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Informativo técnico Divosan Divosept 350 – Johnson Diversey Nº 3.0034.0561.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Informativo técnico Divosan Forte – Johnson Diversey Nº 3.2661.0161.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Informativo técnico Divosan Divoquat Forte – Johnson Diversey Nº 3.0034.0410.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Informativo técnico Divosan Hypochlorite – Johnson Diversey Nº 3.2661.0146.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 15 de 23 de agosto de 1988: determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentadas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de setembro de 1988.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **J. Dairy. Sci.**, v.81, p.2760-2764, 1998.

MIYANO, N.; OIE, S.; KAMIYA, A. Efficacy of disinfectants and hot water against biofilm cells of *Burkholderia cepacia*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, p.671-674, 2003.

MONTVILLE, R.; SCHAFFNER, D.W. Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.7188-7193, 2003.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **J. Food. Protect.**, v.56, p.34-41, 1993.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **J. Appl. Microbiol.**, v.86, p.576-582, 1999.

PARK, K.D.; KIM, Y.S.; HAM, D.K.; KIM, Y.H.; LU, E.H.B.; SUH, H.; CHOI, K.S. Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. Biomaterial resistance. **ASAIO J.**, v. 46, p.S47-S52, 2000.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; BROOKS, J.D. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **J. Appl. Microbiol.**, v.96, p.110-116, 2004.

PELCZAR, J.R.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. 2ª ed. v.2, São Paulo: **Makron Books**, 1996. 517p.

PIETTE, J.P.G.; IDZIAK, E.S. Role of flagella in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to tendon slices. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.1635-1639, 1991.

PIZZOLITTO, E.L. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga-metálica a base de cobre, de uso na Odontologia – modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.** 1997. 118f. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C.; POZETTI, G.L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminum tubes both unlined and lined with epoxi resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Braz. J. Microbiol.**, v.32, p.340-344, 2001.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B.M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Curr. Sci.**, v.85, p.1299-1307, 2003.

PROSSER, B.L.T.; TAYLOR, D.; DIX, B.A.; CLEELAND, R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **J. Antimicrob. Agents. Chem.**, v.31, p.1502-1506, 1987.

PYLE, B.H.; Mc FETERS, G.A. Iodine sensitivity of bacteria isolated from iodinated water systems. **Can. J. Microbiol.**, v.4, p.520-523, 1989.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, S.; SCHEON, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: an interdisciplinary endeavor**, in Bio-materials science, an introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press, 1996. p.1-8.

RICHARDS, R. Efficacy of sanitizers on *Listeria monocytogenes* biofilm. **Food. Austr.**, v.51, p.624-625, 1999.

RONNER, A.; WONG, A. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-N rubber. **J. Food. Prot.**, v.56, p.750-758, 1993.

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

SAMRAKANDI, M.M.; ROQUES, C.; GEORGES, M. Influence of tropic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramide. **J. Microbiol.**, v.43, p.751-758, 1997.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Microbiologia – Mecanismos das doenças. 3^a ed., Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002. 642p.

SCHWACH, T.S.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopic study on some effects of sodium hypochlorite on attachment of bacteria to stainless steel. **J. Food. Prot.**, v. 47, p.756-759, 1984.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food. Microbiol.**, v.17, p.439-447, 2000.

SMOOT, L.M.; PIERSON, M.D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. **J. Food. Protect.**, v.61, p.1293-1298, 1998.

STEINER, A. E.; MARAGOS, M.M.; BRADLEY, R.L.Jr. Cleanability of stainless steel surfaces with various finishes. **Dairy Food Env. Sanitation.**, v.20, p.250-260, 2000.

STEWART, P.S. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.836-838, 2000.

STOODLEY, P.; CARGO, R.; RUPP, C.J.; WILSON, S.; KLAPPER, I. Biofilm mechanics and shear induced deformation and detachment. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.29, p.36-38, 2002.

STOODLEY, P.; WILSON, S.; HALL-STOODLEY, L.; BOYLE, J.D.; H.M. LAPPIN-SCOTT, H.M.; COSTERTON, J.W. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed Species Biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, p. 5608-5613, 2001.

SUTHERLAND, I.W. Microbial exopolysaccharides – structural subtleties and their consequences. **Pure & Appl. Chem.**, v.69, p.1911-1917, 1997.

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiol.**, v.147, p.3-9, 2001.

- TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. **Emerg. Infect. Dis.**, v.3, p.425-434, 1997.
- TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarín J. SCI.Technol.**, v.25, p.807-815,2003.
- TRACHOO, N.; FRANK, J.F. Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni*-containing biofilms. **J. Food. Protect.**, v.65, p.1110-1116, 2002.
- VIDAL, R.; DOMINGUEZ, M.; URRUTIA, H.; BELLO, H.; GONZALEZ, G.; GARCIA, A.; ZEMELMAN, R. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. **Microbios**, v.86, p.49-58, 1996.
- WALKER, J.T.; ROGERS, J.; KEEVIL, C.W. An investigation of the efficacy of a bromine containing biocide on aquatic consortium of planktonic and biofilm microorganisms including *Legionella pneumophila*. **Biofouling.**, v.8, p.47-54, 1994.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: Biofilm, city of microbes. **J. Bacteriol.**, v.182, p.2675-7679, 2000.
- WILSON, M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. **J. Med. Microbiol.**, v.44, p.79-87, 1995.
- WONG, A.C.L. Biofilms in food processing environments. **J. Dairy. Sci.**, v.81, p.2765-2770, 1998.
- ZOLTAI, P.T.; ZOTTOLA, E.A.; McKAY, L.L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk and milk contact surfaces. **J. Food. Prot.**, v.44, p.204-208, 1981.
- YOKOO, S.; PIZZOLITTO, A.C.; POZETTI, G.L.; PIZZOLITTO, E.L. Aderência e formação do biofilme por *Staphylococcus aureus* ao polietilenotereftalato (PET) usado como embalagem para acondicionamento de medicamento e cosméticos. **Ver. Ciênc. Farm.**, v. 25, p.37-39, 2004.

8. ANEXOS

ANEXO I

Preparação dos reagentes para observação por meio de microscópio eletrônico de varredura

Tampão Fosfato 0,2 M

Solução A

Fosfato monobásico de sódio.....2,76g

Água destilada.....qsp 100,0 ml

Solução B

Fosfato dibásico de sódio.....7,17g

Água destilada.....qsp 100,0 ml

Tampão Fosfato 0,2 M [pH 7,1]

Solução A.....50,0 ml

Solução B.....50,0 ml

Tampão Fosfato 0,1 M [pH 7,1]

Tampão Fosfato 0,2M e pH 7,1.....50,0 ml

Água destilada.....50,0 ml

Solução Tampão 0,1 M-Glutaraldeído a 2,5%

Tampão 0,1 M e pH 7,1.....	48,5 ml
Glutaraldeído a 50% em solução aquosa.....	5,0 ml

Solução de Etanol a 15%

Álcool etílico absoluto.....	15,0 ml
Água destilada.....	85,0 ml

Solução de Etanol a 30%

Álcool etílico absoluto.....	30,0 ml
Água destilada.....	70,0 ml

Solução de Etanol a 50%

Álcool etílico absoluto.....	50,0 ml
Água destilada.....	50,0 ml

Solução de Etanol a 70%

Álcool etílico absoluto.....	70,0 ml
Água destilada.....	30,0 ml

Solução de Etanol a 90%

Álcool etílico absoluto.....	90,0 ml
Água destilada.....	10,0 ml

Etanol absoluto

Álcool etílico absoluto.....100,0 ml

ANEXO II

Resultados detalhados das quantificações de células viáveis após o tratamento com os desinfetantes estudados

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *S. aureus* DE 24 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	5×10^6	$1,6 \times 10^6$	2×10^6
Ácido iodado	3×10^0	0	$1,4 \times 10^2$
Biguanida	8×10^3	$2,7 \times 10^3$	3×10^3
Quaternário amônio	8×10^4	9×10^0	6×10^1
Ácido peracético	2×10^0	0	4×10^2
Clorado	6×10^0	0	0

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	5000000	1600000	2000000
Ácido iodado	3	0	140
Biguanida	8000	2700	4000
Quaternário amônio	80000	9	60
Ácido peracético	2	0	400
Clorado	6	0	0

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	6,70	6,20	6,30
Ácido iodado	0,48	0	2,15
Biguanida	3,90	3,43	3,60
Quaternário amônio	4,90	0,95	1,78
Ácido peracético	0,30	0	2,60
Clorado	0,78	0	0

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	6,40	0,26
Ácido iodado	0,88	1,13
Biguanida	3,64	0,24
Quaternário amônio	2,54	2,08
Ácido peracético	0,97	1,42
Clorado	0,26	0,45

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *S. aureus*
DE 72 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	5,8 x 10 ⁶	5,5 x 10 ⁵	6 x 10 ⁵
Ácido iodado	0	8 x 10 ¹	1,1 x 10 ¹
Biguanida	3,6 x 10 ³	4 x 10 ³	3 x 10 ³
Quaternário amônio	2,2 x 10 ²	5 x 10 ²	4,5 x 10 ²
Ácido peracético	5 x 10 ⁰	4 x 10 ⁰	6 x 10 ⁰
Clorado	0	2 x 10 ¹	0

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	5800000	550000	600000
Ácido iodado	0	80	11
Biguanida	3600	4000	3000
Quaternário amônio	220	500	450
Ácido peracético	5	4	6
Clorado	0	20	0

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	6,76	5,74	5,78
Ácido iodado	0	1,90	1,04
Biguanida	3,56	3,60	3,48
Quaternário amônio	2,34	2,70	2,65
Ácido peracético	0,70	0,60	0,78
Clorado	0	1,30	0

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	6,09	0,58
Ácido iodado	0,98	0,95
Biguanida	3,55	0,06
Quaternário amônio	2,56	0,20
Ácido peracético	0,69	0,09
Clorado	0,43	0,75

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *S. aureus*
DE 120 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	4×10^5	2×10^5	$5,5 \times 10^6$
Ácido iodado	$2,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	4×10^3
Biguanida	1×10^2	3×10^4	$2,6 \times 10^3$
Quaternário amônio	$4,4 \times 10^4$	1×10^0	7×10^3
Ácido peracético	0	6×10^0	3×10^1
Clorado	1×10^0	0	3×10^0

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	400000	200000	5500000
Ácido iodado	260	23	4000
Biguanida	100	30000	2600
Quaternário amônio	44000	1	7000
Ácido peracético	0	6	30
Clorado	1	0	3

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	5,60	5,30	6,74
Ácido iodado	2,41	1,36	3,60
Biguanida	2	4,48	3,41
Quaternário amônio	4,64	0	3,85
Ácido peracético	0	0,78	1,48
Clorado	0	0	0,48

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	5,88	0,76
Ácido iodado	2,45	1,12
Biguanida	3,30	1,24
Quaternário amônio	2,83	2,48
Ácido peracético	0,75	0,74
Clorado	0,16	0,28

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *S. aureus* EM SUSPENSÃO (células planctônicas) APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Ácido iodado	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Biguanida	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Quaternário amônio	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Ácido peracético	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Clorado	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Controle positivo	$1,8 \times 10^5$ UFC/ml	$2,5 \times 10^5$ UFC/ml	$3,5 \times 10^5$ UFC/ml

Números em log UFC/ml

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Ácido iodado	0	0	0
Biguanida	0	0	0
Quaternário amônio	0	0	0
Ácido peracético	0	0	0
Clorado	0	0	0
Controle positivo	5,26	5,40	5,54

Médias em log UFC/ml e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Ácido iodado	0 logUFC/ml	0
Biguanida	0 logUFC/ml	0
Quaternário amônio	0 logUFC/ml	0
Ácido peracético	0 logUFC/ml	0
Clorado	0 logUFC/ml	0
Controle positivo	5,40 logUFC/ml	0,14

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *E. coli* DE 24 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	$1,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	2×10^5
Ácido iodado	2×10^2	4×10^0	$1,6 \times 10^2$
Biguanida	6×10^0	$1,4 \times 10^1$	$2,2 \times 10^2$
Quaternário amônio	7×10^1	0	6×10^0
Ácido peracético	0	3×10^0	4×10^0
Clorado	2×10^0	3×10^0	0

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	120000	350000	200000
Ácido iodado	200	4	160
Biguanida	6	14	220
Quaternário amônio	70	0	6
Ácido peracético	0	3	4
Clorado	2	3	0

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	5,08	5,54	5,30
Ácido iodado	2,30	0,60	2,20
Biguanida	0,78	1,15	2,34
Quaternário amônio	1,85	0	0,78
Ácido peracético	0	0,48	0,60
Clorado	0,30	0,48	0

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	5,31	0,23
Ácido iodado	1,70	0,95
Biguanida	1,42	0,82
Quaternário amônio	0,88	0,93
Ácido peracético	0,36	0,32
Clorado	0,26	0,24

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *E. coli* DE 72 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	4×10^4	7×10^3	$4,5 \times 10^4$
Ácido iodado	1×10^0	2×10^0	1×10^0
Biguanida	7×10^1	$6,4 \times 10^1$	$6,9 \times 10^1$
Quaternário amônio	3×10^2	2×10^2	$3,6 \times 10^2$
Ácido peracético	$3,5 \times 10^1$	4×10^1	$4,5 \times 10^1$
Clorado	0	0	0

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	40000	7000	45000
Ácido iodado	1	2	1
Biguanida	70	64	69
Quaternário amônio	300	200	360
Ácido peracético	35	40	45
Clorado	0	0	0

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	4,60	3,85	4,65
Ácido iodado	0	0,30	0
Biguanida	1,85	1,81	1,84
Quaternário amônio	2,48	2,30	2,56
Ácido peracético	1,54	1,60	1,65
Clorado	0	0	0

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	4,37	0,45
Ácido iodado	0,10	0,17
Biguanida	1,83	0,02
Quaternário amônio	2,45	0,13
Ácido peracético	1,60	0,06
Clorado	0	0

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *E. coli* DE 120 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	3×10^4	$2,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
Ácido iodado	$1,5 \times 10^2$	2×10^0	0
Biguanida	8×10^1	$6,7 \times 10^2$	1×10^2
Quaternário amônio	$1,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	8×10^1
Ácido peracético	3×10^2	$6,9 \times 10^1$	$1,3 \times 10^2$
Clorado	2×10^0	4×10^0	0

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	30000	28000	160000
Ácido iodado	150	2	0
Biguanida	80	670	100
Quaternário amônio	13	150	80
Ácido peracético	300	69	130
Clorado	2	4	0

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	4,48	4,45	5,20
Ácido iodado	2,18	0,30	0
Biguanida	1,90	2,83	2
Quaternário amônio	1,11	2,18	1,90
Ácido peracético	2,48	1,83	2,11
Clorado	0,30	0,60	0

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	4,71	0,42
Ácido iodado	0,83	1,18
Biguanida	2,24	0,51
Quaternário amônio	1,73	0,55
Ácido peracético	2,14	0,33
Clorado	0,30	0,30

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *E. coli* EM SUSPENSÃO
(células planctônicas) APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Ácido iodado	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Biguanida	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Quaternário amônio	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Ácido peracético	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Clorado	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Controle positivo	$2,7 \times 10^5$ UFC/ml	$3,8 \times 10^5$ UFC/ml	$5,5 \times 10^5$ UFC/ml

Números em log UFC/ml

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Ácido iodado	0	0	0
Biguanida	0	0	0
Quaternário amônio	0	0	0
Ácido peracético	0	0	0
Clorado	0	0	0
Controle positivo	5,43	5,58	5,74

Médias em log UFC/ml e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Ácido iodado	0	0
Biguanida	0	0
Quaternário amônio	0	0
Ácido peracético	0	0
Clorado	0	0
Controle positivo	5,58	0,16

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *Listeria monocytogenes* DE 24 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	4 x 10 ⁶	5 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁶
Ácido iodado	2,2 x 10 ²	3,5 x 10 ²	2,9 x 10 ²
Biguanida	2,1 x 10 ²	2,5 x 10 ¹	1,2 x 10 ²
Quaternário amônio	1,1 x 10 ²	1 x 10 ²	9,5 x 10 ¹
Ácido peracético	4 x 10 ¹	5 x 10 ¹	4,5 x 10 ¹
Clorado	1,5 x 10 ¹	1,4 x 10 ¹	1,5 x 10 ¹

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	4000000	5000000	4500000
Ácido iodado	220	350	290
Biguanida	210	25	120
Quaternário amônio	110	100	95
Ácido peracético	40	50	45
Clorado	15	14	15

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	6,60	6,70	6,65
Ácido iodado	2,34	2,54	2,46
Biguanida	2,32	1,40	2,08
Quaternário amônio	2,04	2	1,98
Ácido peracético	1,60	1,69	1,65
Clorado	1,18	1,15	1,18

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	6,65	0,05
Ácido iodado	2,45	0,10
Biguanida	1,93	0,48
Quaternário amônio	2,01	0,03
Ácido peracético	1,65	0,04
Clorado	1,17	0,02

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *Listeria monocytogenes* DE 72 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	1,5 x 10 ⁶	2 x 10 ⁷	1 x 10 ⁷
Ácido iodado	2 x 10 ⁰	7,8 x 10 ¹	4 x 10 ¹
Biguanida	2,3 x 10 ²	1,5 x 10 ²	1,9 x 10 ²
Quaternário amônio	1,9 x 10 ¹	5,7 x 10 ¹	3,8 x 10 ¹
Ácido peracético	2 x 10 ⁰	7,5 x 10 ¹	3,9 x 10 ¹
Clorado	1 x 10 ⁰	3 x 10 ⁰	2 x 10 ⁰

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	1500000	20000000	10000000
Ácido iodado	2	78	40
Biguanida	230	150	190
Quaternário amônio	19	57	38
Ácido peracético	2	75	39
Clorado	1	3	2

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	6,18	7,30	7
Ácido iodado	0,30	1,89	1,60
Biguanida	2,36	2,18	2,28
Quaternário amônio	1,28	1,76	1,58
Ácido peracético	0,30	1,88	1,59
Clorado	0	0,48	0,30

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	6,83	0,58
Ácido iodado	1,26	0,85
Biguanida	2,27	0,09
Quaternário amônio	1,54	0,24
Ácido peracético	1,26	0,84
Clorado	0,26	0,24

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DO BIOFILME DE *Listeria monocytogenes* DE 120 HORAS APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

Resultados em UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	4,5 x 10 ⁵	2 x 10 ⁶	7,7 x 10 ⁶
Ácido iodado	9 x 10 ¹	8,7 x 10 ¹	1 x 10 ²
Biguanida	1,4 x 10 ²	6,3 x 10 ²	6,5 x 10 ³
Quaternário amônio	1 x 10 ¹	7 x 10 ¹	2 x 10 ¹
Ácido peracético	1 x 10 ¹	1,5 x 10 ¹	1,6 x 10 ¹
Clorado	1,1 x 10 ¹	1 x 10 ¹	1,2 x 10 ¹

Números Inteiros

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	450000	2000000	7700000
Ácido iodado	90	87	100
Biguanida	140	630	6500
Quaternário amônio	10	70	20
Ácido peracético	10	15	16
Clorado	11	10	12

Números em log UFC/cm²

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Controle Positivo	5,65	6,30	6,89
Ácido iodado	1,95	1,94	2
Biguanida	2,15	2,78	3,81
Quaternário amônio	1	1,85	1,30
Ácido peracético	1	1,17	1,20
Clorado	1,04	1	1,07

Média em log UFC/cm² e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Controle Positivo	6,28	0,62
Ácido iodado	1,96	0,03
Biguanida	2,91	0,84
Quaternário amônio	1,39	0,43
Ácido peracético	1,12	0,10
Clorado	1,04	0,03

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *L. monocytogenes* EM SUSPENSÃO (células planctônicas) APÓS A AÇÃO DE DESINFETANTES

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Ácido iodado	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Biguanida	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Quaternário amônio	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Ácido peracético	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Clorado	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Controle positivo	$3,8 \times 10^5$ UFC/ml	$3,5 \times 10^5$ UFC/ml	6×10^5 UFC/ml

Números em log UFC/ml

	1º ENSAIO	2º ENSAIO	3º ENSAIO
Ácido iodado	0	0	0
Biguanida	0	0	0
Quaternário amônio	0	0	0
Ácido peracético	0	0	0
Clorado	0	0	0
Controle positivo	5,58	5,54	5,78

Médias em log UFC/ml e desvio padrão

	Média	Desvio padrão
Ácido iodado	0	0
Biguanida	0	0
Quaternário amônio	0	0
Ácido peracético	0	0
Clorado	0	0
Controle positivo	5,63	0,13