**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente
a um sanificante à base de composto de quaternário de amônio
utilizado na indústria de laticínios**

Ana Cláudia Ribeiro Rossi

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos

**Piracicaba
2008**

Ana Cláudia Ribeiro Rossi
Engenheiro Agrônomo

**Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um
sanificante à base de composto de quaternário de amônio utilizado na
indústria de laticínios**

Orientador:

Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Rossi, Ana Cláudia Ribeiro

Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto de quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios / Ana Cláudia Ribeiro Rossi. - Piracicaba, 2008.
68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactérias patogênicas – Resistência 2. Biofilmes 3. Higiene de alimentos 4. Indústria d laticínios I. Título

CDD 633.1277
R831e

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*Aos meus pais Cláudio e Vera
pelo amor e apoio*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades e pela força nos momentos difíceis.

Ao meu Anjo da Guarda, pela proteção e inspiração.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelo aprendizado e acolhimento durante todos estes anos.

A toda a minha família, principalmente aos meus pais Cláudio e Vera e minha irmã Fabiana pelo imenso apoio, carinho e compreensão.

Ao meu namorado, Thales Simões de Freitas Neves pelo amor e compreensão em todos os momentos.

À minha grande amiga “Ia” pela carinhosa participação na minha criação.

Ao Prof. Dr. Ernani Porto pela orientação e apoio.

À técnica do Laboratório de Higiene e Laticínios, Denise, pela ajuda, disponibilidade e amizade.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Rose, Cecília e Cléo, pela ajuda e boa vontade.

A todos os funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição.

À FAPESP, pelo financiamento deste projeto.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À empresa BIOSAN pelo fornecimento do sanificante para realização deste trabalho.

À empresa SANI QUÍMICA pelo fornecimento dos detergentes para realização deste trabalho.

Às minhas queridas amigas da República Trem q Pula pela sincera amizade.

Às minhas amigas Carolina Rodrigues da Fonseca, Isis Sabrina Scarso, Milena Martinelli Watanuki, Ingridy Simone Ribeiro e Cristiane Zago Zacari pela amizade, convívio e conselhos.

Às minhas amigas Carolina Schultz Lopes e Daniela Alves de Oliveira pela grande amizade e companheirismo na convivência em nosso querido apartamento.

Às minhas amigas Bianca Assis Barbosa Martins, Luciana Junqueira Tavares Correia e Thábata Persinotti Martini pela grande amizade.

Às minhas estagiárias Juliana Aparecida Battistella Berti, Nataly Maria Viva de Toledo e Natália Sergio Xavier pela ajuda e amizade.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 A importância da higienização na indústria de alimentos.....	12
2.2 Biofilmes na indústria de alimentos e de laticínios.....	12
2.3 Importância do <i>B. cereus</i> em alimentos e sua presença em biofilmes.....	14
2.4 Higienização na indústria de laticínios e o controle de <i>B. cereus</i> em biofilmes.....	17
2.4.1 Compostos quaternários de amônio (QACs).....	18
2.5 Resistência das células bacterianas nos biofilmes.....	20
2.5.1 Resistência conferida pela matriz polimérica.....	21
2.5.2 Adaptação das células dos biofilmes aos agentes antimicrobianos.....	23
2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de um agente antimicrobiano.....	25
3 METODOLOGIA.....	26
3.1 Avaliação da resistência das células vegetativas de <i>B. cereus</i> em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios.....	26
3.1.1 Obtenção e identificação de células de <i>B. cereus</i>	26
3.1.2 Obtenção da suspensão padronizada de células vegetativas.....	27
3.1.3 Desenvolvimento do biofilme com células vegetativas de <i>B. cereus</i>	28
3.1.3.1 Preparo dos cupons de aço inoxidável.....	28
3.1.3.2 Condicionamento da superfície dos cupons.....	28
3.1.3.3 Adesão das células vegetativas de <i>B. cereus</i> aos cupons de aço inoxidável.....	29
3.1.3.4 Avaliação da adesão nos cupons de aço inoxidável.....	30
3.1.4 Procedimento de higienização dos cupons com biofilmes de células vegetativas.....	32
3.1.5 Avaliação da adesão nos cupons de aço inoxidável após a higienização.....	34
3.2 Avaliação da resistência de esporos de <i>B. cereus</i> em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios.....	34
3.2.1 Obtenção e padronização dos esporos.....	34
3.2.2 Desenvolvimento do biofilme com esporos de <i>B. cereus</i>	35

3.2.2.1 Avaliação da adesão de esporos nos cupons de aço inoxidável.....	36
3.2.3 Procedimento higienização dos cupons com biofilmes de esporos.....	36
3.2.4 Avaliação da adesão de esporos nos cupons de aço inoxidável após a higienização.....	36
3.3 Exposição das células vegetativas de <i>B. cereus</i> a doses subletais do sanificante para avaliação da aquisição de resistência.....	36
3.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	36
3.3.2 Exposição das células vegetativas a concentrações subletais do sanificante.....	38
3.3.3 Verificação da aquisição de resistência pela cepa de <i>B. cereus</i>	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Avaliação da resistência das células vegetativas de <i>B. cereus</i> em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios.....	41
4.1.1 Avaliação da adesão nos cupons de aço inoxidável.....	41
4.1.2 Avaliação da adesão nos cupons de aço inoxidável após a higienização.....	43
4.2 Avaliação da resistência de esporos de <i>B. cereus</i> em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios.....	45
4.2.1 Avaliação da adesão de esporos nos cupons de aço inoxidável.....	45
4.2.2 Avaliação da adesão de esporos nos cupons de aço inoxidável após a higienização.....	46
4.3 Exposição das células vegetativas de <i>B. cereus</i> a doses subletais do sanificante, para avaliação da aquisição de resistência.....	48
4.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	48
4.3.2 Aquisição de resistência ao sanificante pelo crescimento bacteriano em concentrações subletais.....	50
4.3.2.1 Avaliação da aquisição de resistência da cepa exposta a concentração de 3,7µg do composto ativo /mL (tubo 8) durante 28 dias.....	51
4.3.2.2 Avaliação da aquisição de resistência da cepa exposta a concentração de 1,8µg do composto ativo /mL (tubo 9) durante 28 dias.....	54
4.3.2.3 Avaliação da aquisição de resistência da cepa exposta a concentração de 0,9µg do composto ativo /mL (tubo 10) durante 28 dias.....	56
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto de quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios

O *Bacillus cereus* é um patógeno amplamente distribuído na natureza, relacionado a intoxicações alimentares e causador da coagulação doce do leite. A intoxicação pode ocorrer após a ingestão de alimentos nos quais a bactéria produziu a toxina. Em laticínios, o *B. cereus* é problemático por sua habilidade de formar esporos resistentes ao calor e sobreviver aos tratamentos térmicos, como a pasteurização e UHT. As espécies de *Bacillus* são frequentemente isoladas de leite pasteurizado e UHT e evidências indicam que os biofilmes formados nas superfícies dos equipamentos de processamento são uma das principais fontes de contaminação. No biofilme, as células ou esporos aderidos, têm aumentada sua resistência e podem resistir ao processo de sanificação, se tornando focos de disseminação de bactérias no processo. A matriz polimérica do biofilme reage e neutraliza os agentes sanificantes, expondo as bactérias em seu interior a doses subletais, podendo levar a aquisição de resistência. Neste estudo, biofilmes de células vegetativas *B. cereus* foram desenvolvidos na superfície de aço inoxidável, tipo 304, com filme de condicionamento de leite. A adesão média das células foi de $1,4 \times 10^5$ UFC/cm². Também foram desenvolvidos biofilmes de esporos, com adesão média em aço inoxidável de $1,4 \times 10^4$ UFC/cm². Foi avaliada a resistência das células vegetativas e esporos de *B. cereus* em biofilmes, ao processo simulado de higienização por clean in place (CIP) realizado em laticínios. Após a limpeza a adesão das células vegetativas em aço inoxidável foi reduzida a aproximadamente 1 CFU/cm². Após a sanificação, os resultados permaneceram inalterados. A contaminação remanescente foi relacionada com a maior resistência das células nos biofilmes formados. Após a limpeza e sanificação a adesão média dos esporos foi de $8,9 \times 10^1$ UFC/cm² e $3,3 \times 10^1$ UFC/cm², respectivamente. Tendo em vista este resultado, foi observado que esporos de *B. cereus* são mais difíceis de remover de superfícies de aço inoxidável do que células vegetativas, com procedimentos CIP. Finalmente, foi realizada a exposição de células vegetativas de *B. cereus* a três concentrações subletais (3,9; 1,8 e 0,9 µg/mL) de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio para avaliação da adaptação pelo método da concentração inibitória mínima (CIM). A aquisição de resistência foi avaliada pela comparação do valor inicial de CIM (7,4 µg/mL), com os valores finais, após 28 dias de exposição. Após o período de adaptação, o valor de CIM encontrado foi o dobro do original (14,9 µg/mL) indicando aquisição de resistência ao sanificante pela cepa. Foi constatado ainda que o cultivo da cepa na menor concentração subletal apresentou resultados mais coerentes, sugerindo que exposição a doses subletais mais brandas resulta em uma maior resposta adaptativa.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*, Laticínios, Biofilmes, Sanificantes

ABSTRACT

Study of *Bacillus cereus* biofilmes and planktonic cells front to a quaternary ammonium based sanitizer used in the dairy industry

Bacillus cereus is a pathogen widely distributed in the environment and a serious problem in the dairy industry because of its ability to form heat-resistant spores that can survive pasteurization and UHT treatments. This bacteria is responsible for foodborne diseases in man due to production of toxins that may cause gastroenteritis, diarrhoea and vomiting. In addition, *B. cereus* is responsible for spoilage of pasteurized milk and cream referred to as "sweet curdling". *Bacillus* strains are frequently isolated from pasteurized and UHT treated milk and evidence indicates that biofilm formed on processing equipment surfaces are major sources of milk contamination. In biofilms, adherent cells and spores acquire increased resistance and persist to the sanitization process, becoming sources of bacteria dissemination in food processing. The extracellular polymeric matrix neutralizes the sanitizing agents and exposing the bacteria in biofilms to sublethal concentrations can lead to an increased resistance. In this study, biofilms of *B. cereus* vegetative cells were developed in a 304 stainless steel (SS) surface with a milk conditioning film. The mean adhesion of cells on SS surface was 1.4×10^5 CFU/cm². Biofilms of *B. cereus* spores were also developed, and the mean adhesion found was 1.4×10^4 CFU/cm². The resistance of *B. cereus* vegetative cells and spores in biofilms to a simulated clean-in-place (CIP) procedure used in dairy industry was evaluated. After cleaning procedure, the population of vegetative cells in the SS surface was reduced to approximated 1 CFU/cm². After sanitizing procedure, the cell count remained unaltered. The remaining contamination was related with the increased resistance of cells in the developed biofilms. After cleaning and sanitizing procedures, the mean of spore adhesion found was 8.9×10^1 CFU/cm² and 3.3×10^1 CFU/cm², respectively. These results show that *B. cereus* spores are more difficult to remove from SS surfaces than vegetative cells using CIP procedures. Finally, *B. cereus* vegetative cells were exposed to three different sublethal concentrations (3.9; 1.8 and 0.9 µg/mL) of alkyl amidopropyl dimethyl benzyl ammonium chloride, for evaluation of adaptation, using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test. The acquired resistance was evaluated by comparing the initial MIC value (7.4 µg/mL) with final MICs, after 28 days of exposure. After the adaptation period, with exception of an experiment where the MIC was threefold the original value (29.8 µg/mL), in the other experiments the MICs found was double (14.9 µg/mL) of the original MIC, indicating acquisition of resistance by the *B. cereus* strain. It was observed that the growth of cells in the mildest sublethal concentration (0.9 µg/mL) resulted in more consistent effects, suggesting that the exposure to mildest sublethal concentrations results in higher adaptive responses.

Keywords: *Bacillus cereus*, Dairy industry, Biofilms, Sanitizers

1 INTRODUÇÃO

Um dos aspectos mais importantes no controle a qualidade na indústria de laticínios é a higiene. Atualmente, em função de diversos fatores, como o aumento de concorrência com os produtos importados, consumidor mais exigente e fiscalização sanitária mais acirrada, muitas indústrias aumentaram os investimentos na área de higienização, com o uso mais freqüente da desinfecção química (ATHAYDE, 1998; LANGSRUD et al., 2003).

O leite, devido a sua característica de composição complexa (minerais, açúcares, proteínas, carboidratos, gorduras), constitui-se em rica fonte de alimento para as bactérias (ATHAYDE, 1998). Tradicionalmente, as pesquisas sobre bactérias têm sido focadas na fisiologia de células bacterianas no estado planctônico ou isoladas. No entanto, o modelo de célula planctônica não reflete com precisão o estilo de vida microbiano predominante, que é a associação dos microrganismos com superfícies, fato que na última década, as pesquisas têm intensamente demonstrado. O processamento moderno de alimentos auxilia e seleciona a formação de biofilmes bacterianos em superfícies de contato com alimentos, devido à produção em massa de produtos, prolongados ciclos de produção e vastas superfícies para formação de biofilmes (LINDSAY; VON HOLY, 2006). As bactérias em biofilmes se tornam altamente resistentes aos processos de limpeza e sanificação, podendo representar uma fonte de contaminação para os alimentos, comprometendo a qualidade e segurança do produto final (FAILLE et al., 2002; PARKAR; FLINT; BROOKS, 2004).

Os biofilmes podem ser formados por todos os tipos de microrganismos, entre eles a bactéria formadora de esporos *B. cereus* (POULSEN, 1999; RYU; BEUCHAT, 2005). O *B. cereus* tem grande importância como contaminante de produtos pasteurizados na indústria de laticínios, pois os esporos resistem à pasteurização e ao tratamento UHT (*Ultra High Temperature*) e podem aderir em equipamentos da linha de processamento contaminando os produtos (LINDSAY; BRÖZEL; VON HOLY, 2006; VIDAL-MARTINS; ROSSI JR.; REZENDE-LAGO, 2005). Schocken-iturrino, Nader Filho e Dimenstein (1996), ao analisarem 32 caixas de leite longa vida de quatro marcas diferentes na região de Ribeirão Preto (SP), verificaram a presença de bactérias do gênero *Bacillus* em 19 delas (59,3%). Rezende et al., (2000) analisaram 120 amostras de leite UHT de quatro marcas diferentes e encontraram espécies do grupo do *B. cereus* em 34,1% delas. Bahout (2000), ao estudar 60 amostras de leite UHT no Egito, encontrou *Bacillus* sp. em 18,3% e

B. cereus em 29,2% delas. Vidal-Martins, Rossi Jr.e Rezende-lago (2005) encontraram amostras positivas para *B. cereus* em 8 das 11 marcas estudadas.

Para prover o consumidor com um produto sadio e seguro, é essencial controlar os microrganismos em alimentos e nos equipamentos utilizados no processamento. Na indústria de alimentos, geralmente um programa efetivo de limpeza e sanificação é parte de um processo para inativar microrganismos e prevenir a acúmulo de células microbianas e biofilmes nas superfícies dos equipamentos (PENG; TSAI; CHOU, 2002).

O *B. cereus* é um microrganismo patogênico, formador de esporos, que pode sobreviver à pasteurização do leite empregada nos laticínios. Nos biofilmes, estes microrganismos se tornam altamente resistentes aos processos de limpeza e sanificação e se tornam uma fonte de contaminação para o leite e produtos derivados, comprometendo a qualidade e segurança do produto final. Portanto, os estudos sobre a inativação e remoção de células microbianas capazes de aderir às superfícies e sobre os efeitos dos sanificantes nos biofilmes, devem ser aprofundados.

Este experimento foi conduzido no período de maio a novembro de 2007. Os objetivos foram avaliar o comportamento de células vegetativas e esporos de *B. cereus* em biofilmes frente ao processo simulado de sanificação empregado em laticínios e avaliar a aquisição de resistência de células de *B. cereus* expostas a concentrações subletais de um composto de quaternário de amônio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A importância da higienização na indústria de alimentos

Na indústria de alimentos, a higiene tem como finalidade garantir a qualidade sanitária final do produto e preservar a saúde do consumidor (ATHAYDE, 1998).

A higienização na indústria de alimentos visa basicamente a preservação da pureza, da palatabilidade e da qualidade microbiológica dos alimentos. Auxilia, portanto, na obtenção de um produto que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, tenha uma boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo riscos à saúde do consumidor.

O processo de higienização é dividido em duas etapas bem definidas: a limpeza e a sanificação. O objetivo primordial da limpeza é a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras e sais minerais. A sanificação tem por objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos deteriorantes a níveis considerados seguros. A limpeza, sem dúvida, reduz a carga microbiana das superfícies, mas não a índices satisfatórios. Por isso, a sanificação é indispensável (ANDRADE; MACEDO, 1996).

2.2 Biofilmes na indústria de alimentos e de laticínios

Superfícies de equipamentos ou utensílios que entram em contato com alimentos durante o processo de industrialização não devem aumentar a incidência de microrganismos nos alimentos, sejam eles alteradores ou patogênicos. No entanto, sabe-se que, sob determinadas condições, os microrganismos podem se depositar, aderir e interagir com as superfícies, iniciando assim, o crescimento celular. A multiplicação forma colônias e quando a massa é suficientemente grande para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, formam-se os chamados biofilmes (ANDRADE; MACEDO, 1996).

Na natureza, as bactérias ocorrem predominantemente na forma de biofilmes (VEENING et al., 2006). Um biofilme pode ser definido como uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície, produzindo substâncias poliméricas extracelulares e interagindo uns com os outros (LINDSAY; VON HOLY, 2006). Uma importante característica da formação dos biofilmes é a dependência crítica da presença das substâncias extracelulares que constituem a matriz polimérica, na qual as células são envoltas (VEENING et al., 2006). Materiais não

celulares, como minerais, produtos corrosivos e cristais também podem ser encontrados na matriz polimérica (LINDSAY; VON HOLY, 2006).

Os biofilmes podem ser formados por todos os tipos de microrganismos, incluindo microrganismos deteriorantes e patogênicos. Algumas bactérias possuem uma tendência maior para formá-los. Entre elas, as mais comuns são as *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* e *Bacillus*. Biofilmes podem ser formados em uma grande variedade de superfícies, bióticas e abióticas, nos quais nutrientes são disponíveis (LINDSAY; VON HOLY, 2006). Embora os biofilmes formados por mais de uma espécie de bactérias apresentem maiores vantagens metabólicas em ambientes naturais, biofilmes formados por apenas uma espécie de bactéria tendem a colonizar substratos artificiais, como os implantes médicos e superfícies de equipamentos em indústrias de laticínios (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003).

As células presentes nos biofilmes bacterianos possuem fisiologia, ecologia e impactos médicos e comerciais distintos das células do mesmo microrganismo, crescendo isoladamente ou em culturas planctônicas. Estas diferenças não apenas contribuem para a sua natureza problemática, como infecções, bio-obstrução, biocorrosão, biodeterioração, etc., mas também tornam os biofilmes um dos nichos ambientais mais prováveis para o desenvolvimento de resistência e seleção microbiana (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002).

A adesão e a formação de biofilmes microbianos podem ser indesejáveis sob diversos aspectos na indústria de alimentos e no que se refere aos aspectos microbiológicos a adesão pode constituir-se de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, que resultam em sérios problemas de higiene, de saúde ou de ordem econômica (ANDRADE; MACEDO, 1996). Além disso, os biofilmes podem entupir tubulações, atrasar o tempo de processamento nas plantas, causar corrosão do aço inoxidável e resultar em uma transferência de calor reduzida em trocadores de calor de placas (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2004).

O leite pode ser uma fonte de bactérias ou esporos que podem aderir às superfícies internas dos equipamentos (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003). Os biofilmes são elementos de interesse para a indústria de laticínios, já que as células liberadas dos biofilmes podem contaminar o leite e seus derivados (PARKAR et al., 2001). As pesquisas envolvendo biofilmes nas indústrias de laticínios têm sido concentradas em espécies de *Pseudomonas* e em patógenos de origem alimentar. Existem poucas publicações sobre bactérias formadoras de esporos (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003). Como esporos são mais resistentes aos tratamentos

térmicos, como a pasteurização empregada em laticínios, a aderência de esporos nas superfícies de aço inoxidável provavelmente é um importante fator para o estabelecimento dos biofilmes (PARKAR et al., 2001). Assim que a etapa da adesão se completa, a colonização pode ocorrer quando as condições se tornam favoráveis para a germinação dos esporos. Portanto, esporos e bactérias em biofilmes são de extrema importância para a indústria de alimentos, em função da sua forte aderência e alta resistência a procedimentos de higienização, que é intensificada pela proteção conferida pela matriz polimérica (FAILLE; FONTAINE; BEÂNEÂZECH, 2001).

2.3 Importância do *B. cereus* em alimentos e sua presença em biofilmes

O *B. cereus* é uma bactéria Gram positiva, em forma de bastonete, aeróbica facultativa e formadora de esporos (VALERO et al., 2006). As linhagens de *B. cereus* possuem características variadas de crescimento e sobrevivência. Algumas linhagens são psicrotróficas, sendo capazes de crescer a 4 °C, mas não a 35°C, enquanto outras linhagens são mesófilas e podem crescer entre 15°C e 55°C. A temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 40°C. Assim como a temperatura, o pH mínimo para o crescimento varia conforme a linhagem e depende do agente acidificante do meio. O microrganismo pode se desenvolver em ambientes com valores de pH variando entre 5,0 e 8,8, mas o crescimento não ocorre em meios com valor de pH 5,6, quando acidificados com ácido lático. A atividade de água mínima para o crescimento é de 0,95, sendo o crescimento bastante reduzido, quando a concentração de NaCl é de 7,5% (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS/ICMSF, 1996). Os esporos são resistentes à desidratação (RYU; KIM; BEUCHAT, 2005).

Inúmeras linhagens de *B. cereus* produzem grande variedade de metabólitos extracelulares, incluindo enzimas extracelulares que podem causar a deterioração de alimentos e toxinas, caracterizando-o como microrganismo patogênico (LINDSAY et al., 2002; RYU; KIM; BEUCHAT, 2005). A intoxicação alimentar por *B. cereus* pode ocorrer após a ingestão de alimentos nos quais o microrganismo se desenvolveu e produziu a toxina. *B. cereus* é produtor de dois tipos de toxina. A toxina diarréica é uma proteína produzida por células ativas e é termolábil, podendo ser inativada pela exposição à temperatura de 56°C por 30 minutos. Esta toxina é antigênica, inativada pela tripsina e instável em pH inferior a 4,0. A produção desta toxina parece estar associada à esporulação, sendo produzida no trato intestinal (ICMSF, 1996). A toxina emética é um peptídeo pequeno, não antigênico e é produzida na fase de crescimento estacionária.

É extremamente resistente ao calor (126°C por 90 minutos), a valores de pH extremos (2-11) e às enzimas digestivas. A toxina é pré-formada nos alimentos (ICMSF, 1996).

Inúmeros surtos têm sido relatados nos quais leite e produtos derivados contendo *B. cereus* foram apontados como causadores de enfermidades. Análises de linhagens de *B. cereus* isoladas de leite apontaram que os microrganismos eram, em sua maioria, produtores de toxinas (NOTERMANS et al., 1997). O *B. cereus* tem sido responsável por 1 a 23% dos casos relatados na literatura de doenças transmitidas por alimentos (DTA), que podem se apresentar de duas formas clínicas: a síndrome diarréica e a emética. A síndrome diarréica caracteriza-se por um período de incubação que varia de 8 a 16 horas e seus principais sintomas incluem diarréia intensa e dores abdominais, raramente ocorrendo náuseas e vômitos. O curso da doença é de 12 a 24 horas e geralmente está associada ao consumo de alimentos de composição farinácea, contaminados com alto número de células (aproximadamente 10^6 Unidades Formadoras de Colônias / grama - (UFC/g) ou com a toxina. A síndrome emética caracteriza-se por um período de incubação curto, de 1 a 5 horas após a ingestão da toxina com o alimento, causando vômitos, náuseas e mal estar geral, e por um curso de 6 a 24 horas (CÂMARA, 2002).

O *B. cereus* é amplamente distribuído na natureza. Pode ser encontrado no solo, na poeira, em grãos de cereais, na vegetação, em pêlos de animais e na água e geralmente esta presente em todos os alimentos crus (ICMSF, 1996; RYU; BEUCHAT, 2005). Uma das características mais peculiares do *B. cereus* é sua habilidade de produzir esporos resistentes ao calor. A habilidade de formar esporos garante ao microrganismo a sobrevivência durante as etapas de processamento dos alimentos (RYU; BEUCHAT, 2005; RYU; KIM; BEUCHAT, 2005). Os esporos também são mais resistentes a outros fatores de estresse ambiental, como valores de pH extremos e produtos químicos (RYU; KIM; BEUCHAT, 2005). Os esporos bacterianos são formados por uma capa externa e protetora, um córtex intermediário e um protoplasto interno. As evidências sugerem que a resistência ao calor, e até certo ponto aos produtos químicos, esta relacionada com a natureza desidratada do protoplasto do esporo. Em comparação com as células vegetativas, os esporos bacterianos podem ser 100.000 vezes mais resistentes a agentes químicos (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1992).

Em geral, a resistência térmica dos esporos de *B. cereus* é semelhante à resistência térmica da maioria das bactérias mesófilas formadoras de esporos. No entanto, existe uma considerável variabilidade entre as linhagens, sendo que os esporos de algumas linhagens possuem valores D,

em temperaturas equivalentes, 15 a 20 vezes mais altos do que esporos de linhagens mais suscetíveis ao calor. O valor $D_{95^{\circ}\text{C}}$ para esporos de *B. cereus* em leite pode variar de 1,8 a 3 minutos (ICMSF, 1996).

Os esporos de *B. cereus* são freqüentemente encontrados no leite cru. A principal rota de contaminação do leite é durante o pastejo dos animais, quando os têtos são contaminados com fezes e solo. Os esporos de *B. cereus* também podem aderir aos equipamentos de ordenha e às superfícies dos equipamentos utilizados nas indústrias de laticínios e contaminar o leite (SVEENSON et al., 2006).

Tratamentos térmicos subletais, como a pasteurização empregada em laticínios, podem selecionar o *B. cereus* nos alimentos e as linhagens psicrotróficas podem germinar e se desenvolver durante o armazenamento refrigerado do leite (RYU; BEUCHAT, 2005; RYU; KIM; BEUCHAT, 2005; LINDSAY; VON HOLY, 2006). As espécies de *Bacillus* são freqüentemente isoladas de leite e produtos derivados submetidos ao tratamento térmico, como leite UHT, leite em pó, queijos e iogurte (FAILLE; FONTAINE; BEÂNEÂZECH, 2001). A influência das enzimas proteolíticas pode causar inúmeros problemas em leite e derivados, como a coagulação doce, cor, odor e a gelêificação do leite UHT (JANSTOVÁ et al., 2004).

O *B. cereus* é capaz de formar biofilmes em superfícies de contato com alimentos. Estes biofilmes podem se originar de células vegetativas ou de esporos que aderem nas superfícies. Tem sido relatado que esporos de *Bacillus* spp. podem aderir mais facilmente do que células vegetativas em superfícies de aço inoxidável em função de suas propriedades hidrofóbicas e o processo de limpeza não exerce nenhuma influência sobre os mesmos (POULSEN, 1999; RYU; BEUCHAT, 2005). Wijman et al., (2007) relataram que o *B. cereus* representa 12,4% da microflora constituinte de biofilmes de plantas comerciais de laticínios.

A maioria das células, presentes nos biofilmes de *B. cereus*, se encontra na forma vegetativa. No entanto, durante o desenvolvimento e envelhecimento do biofilme, a esporulação pode ocorrer. É sabido que a porcentagem de produção de esporos por *B. cereus* nos biofilmes é afetado pelas condições ambientais (RYU; BEUCHAT, 2005). Os biofilmes de *B. cereus* podem se comportar como um “ninho” para formação e lançamento de esporos no ambiente de produção de alimentos (WIJMAN et al., 2007). Foi demonstrado que esporos de *B. cereus* aderiram, germinaram e se multiplicaram na superfície de aço inoxidável de um trocador de calor de tubos (WIRTANEN; SALO, 2005). Se o *B. cereus* produzir esporos envoltos pela matriz aderida nas

superfícies de contato com os alimentos, estes esporos podem ter uma resistência muito maior ao estresse ambiental, incluindo sanificantes (RYU; BEUCHAT, 2005).

Segundo Hornstra et al., (2007), a germinação de esporos resulta na perda imediata de resistência. A implementação de uma etapa de germinação anteriormente à higienização pode aumentar a susceptibilidade dos microrganismos aos agentes químicos de limpeza. Em seu experimento, a implementação de uma etapa indutora de germinação de esporos anteriormente ao CIP reduziu o número de sobreviventes em três ciclos decimais, enquanto o tratamento alcalino, quando realizado sozinho, não demonstrou efeito sobre a viabilidade de esporos de *B. cereus*.

De acordo com Lindsay, Brözel e Von Holy (2005), a presença de esporos de *Bacillus* nos biofilmes não foi ainda estudada detalhadamente.

2.4 Higienização na indústria de laticínios e o controle de *B. cereus* em biofilmes

Quando os produtos de leite são contaminados, evidências sugerem que os biofilmes formados nas superfícies dos equipamentos de processamento do leite são os principais responsáveis. Os biofilmes nas indústrias de laticínios, além de conterem bactérias e compostos formados pelas mesmas, contêm também significativa quantidade de resíduos de leite, particularmente proteínas e minerais, como o fosfato de cálcio (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006).

O controle de biofilmes em indústrias de laticínios envolve um processo denominado Clean-In-Place (CIP) ou limpeza no lugar. É um sistema automático e permanente, onde os equipamentos e tubulações são higienizados sem desmontagem. A partir de tanques com soluções de limpeza, são bombeados agentes alcalinos e ácidos. Embora de custo inicial elevado, o sistema torna-se econômico a partir de um determinado tempo de utilização, em virtude das vantagens que oferece. O processo permite um controle eficiente do fluxo, concentração, temperatura e tempo de contato das soluções circuladas. Isto permite menor tempo de higienização, diminui gasto de água e torna o processo econômico. Este sistema pode ser usado para linhas completas ou etapas do processamento. Por meio de circulação das soluções, podem ser higienizadas tubulações, válvulas, bombas, centrífugas, pasteurizadores, evaporadores, dentre outros (ANDRADE; MACEDO, 1996; BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006).

O sistema CIP utilizado na indústria de laticínios envolve vários passos: pré-enxágüe com água para a remoção de resíduos grosseiros, circulação de detergente alcalino, enxágüe,

circulação de detergente ácido e novo enxágüe (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; RIBEIRO-FURTINI, 2005). A lavagem cáustica é realizada geralmente com hidróxido de sódio e a ácida com ácido nítrico, produtos originalmente selecionados pela habilidade de remover resíduos orgânicos (proteínas e lipídios) e inorgânicos (fosfato de cálcio e outros minerais), respectivamente. Em alguns casos, há uma etapa adicional com o uso de um sanificante. Tradicionalmente, sanificantes à base de cloro, como o hipoclorito de sódio, são comumente utilizados na indústria de laticínios. No entanto outros sanificantes, incluindo compostos de quaternário de amônio, estão sendo utilizados ou avaliados para sistemas CIP (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006). O hipoclorito de sódio e os compostos de quaternário de amônio (quaternary ammonium compounds - QACs) são os sanificantes mais utilizados na indústria de alimentos para eliminar células de *B. cereus* livres ou em biofilmes (PENG; TSAI; CHOU, 2002).

2.4.1 Compostos quaternários de amônio (QACs)

Os agentes tensoativos possuem duas regiões na sua estrutura molecular, uma hidrofóbica e outra hidrofílica (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1992). É esta característica de apresentar nas moléculas grupos apolares e polares que as tornam capazes de reduzir a tensão superficial em interfaces líquido-líquido, líquido-gás e sólido-líquido (ANDRADE; MACEDO, 1996). Estes agentes, de acordo com sua ionização em solução aquosa, classificam-se em: compostos aniônicos, compostos catiônicos, compostos não-iônicos e compostos anfóteros. Os QACs são agentes tensoativos catiônicos (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE 1992). Apresentam atividade germicida mais relevante do que sua capacidade de atuar como detergente (ANDRADE; MACEDO, 1996).

As substâncias químicas para serem consideradas deste grupo devem conter em sua estrutura um átomo de nitrogênio ligado covalentemente a quatro grupos de alquil ou aril. Esta carga se mantém no composto quaternário de amônio independente do pH, o que diferencia estas substâncias de compostos anfóteros. Assim, em solução aquosa, os compostos de quaternário de amônio liberam carga elétrica positiva. O cátion é um radical orgânico, sendo o ânion um halogênio. A fórmula geral deste composto é demonstrada pela Figura 1:

Figura 1- Fórmula geral dos compostos quaternários de amônio

Na figura, o R_1 representa cadeias longas de radicais alquil, alquilaril ou seus derivados; R_2 , R_3 e R_4 representam átomos de hidrogênio, alquil, aril ou radicais heterocíclicos e X representa um ânion inorgânico, usualmente cloreto ou brometo. A modificação destes radicais dá origem a um grande número de derivados que possuem atividade germicida. Estes derivados se dividem em quatro classes: sais de alquilbenzildimetilamônio, sais de heterocíclicos alifáticos ou compostos aromáticos, sais de tetraalquil amônio e betáinas (ANDRADE; MACEDO, 1996).

Vários mecanismos de ação associados parecem estar relacionados, originando a atividade germicida dos compostos quaternários de amônio. Dentre estes mecanismos, estão incluídos: inibição enzimática, desnaturação protéica e lesão da membrana citoplasmática (ANDRADE; MACEDO, 1996). Os QACs atuam com eficiência sobre bactérias Gram positivas, podendo ser letal em concentrações baixas, como 0,005%. Para bactérias Gram negativas, concentrações mais altas são necessárias. Apresentam atividade sobre fungos e leveduras, embora sejam fungistáticos e não fungicidas. Os vírus são mais resistentes à ação dos QACs do que fungos e bactérias. Estes sanificantes não apresentam atividade esporicida, mas podem apresentar ação esporostática (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1992).

A água dura reduz a atividade dos QACs. Isto pode provocar o aparecimento de microrganismos resistentes a estes agentes químicos sobre superfícies onde a remoção de resíduos foi efetuada de forma incorreta (ANDRADE; MACEDO, 1996). Os QACs são mais eficientes em condições de pH alcalino ou neutro, do que em pH ácido (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1992).

A atividade antimicrobiana destes compostos é afetada pela matéria orgânica, incluindo leite, soro e fezes. Na indústria de laticínios, as chamadas “pedras de leite” podem proteger os microrganismos dos sanificantes. Uma limpeza adequada antes da aplicação do sanificante pode contornar o problema (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1992). Os QACs são utilizados na sanificação de ambientes, equipamentos, utensílios e manipuladores de alimentos (ANDRADE; MACEDO, 1996). Algumas vantagens e desvantagens estão listadas na tabela a seguir:

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos compostos de quaternário de amônio

Vantagens	Desvantagens
Não corrosivo	Caro
Estáveis a mudanças de temperatura	Baixa atividade em água dura
Atóxico, inodoro e não corrosivo	Pouco efetivo contra esporos
Boa ação de penetração	Problemas com formação de espumas
Efetivo contra microrganismos termodúricos	
Efetivos em condições alcalinas	

Fonte: ANDRADE; MACEDO, 1996.

A escolha do agente sanificante depende do tipo de microrganismo a ser destruído, assim como da integridade do equipamento a ser limpo (DOSTI; GUZEL-SEYDIM; GREENE, 2005). Os sanificantes utilizados na indústria dentro das condições indicadas pelos fabricantes são aprovados em testes como os de suspensão e diluição de uso, alcançando até 5 reduções decimais (RD) após 30 segundos de contato a 20°C com suspensões de microrganismos que são capazes de iniciar processos de adesão às superfícies (MARQUES, 2005). Geralmente, os agentes sanificantes são desenvolvidos com base em pesquisas que utilizam bactérias livres, que possuem características diferentes dos microrganismos dos biofilmes, devido ao seu status fisiológico alterado. Os microrganismos se tornam resistentes aos sanificantes e a outros agentes antimicrobianos quando aderidos às superfícies. Deste modo, os sanificantes testados em suspensão para o uso na indústria de alimentos não correlatam com resultados obtidos nas superfícies e, menos ainda, com casos onde há o desenvolvimento de biofilmes. Portanto, a inativação e remoção das células microbianas, especialmente aquelas capazes de aderir às superfícies de equipamentos utilizados no processamento e desenvolver biofilmes, merecem mais atenção (PENG; TSAI; CHOU, 2002).

2.5 Resistência das células bacterianas nos biofilmes

Os microrganismos podem ser divididos em dois grupos, de acordo com sua fase de crescimento: planctônicos e sésseis. No estágio planctônico, os microrganismos vivem livremente como organismos flutuantes individuais, enquanto na fase sésil, se encontram

aderidos a uma superfície, formando os biofilmes e funcionando como uma comunidade integrada fechada (POULSEN, 1999).

Os biofilmes constituem uma barreira física, protegendo as células de inúmeros fatores de estresse ambiental, como luz ultra-violeta (UV), estresse osmótico, calor, inanição, detergentes ácidos, antibióticos, fagócitos, anticorpos e bacteriófagos. Esta comunidade de células bacterianas fechadas em uma matriz polimérica de produção própria e aderida a uma superfície viva ou inerte, constitui um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência em ambientes hostis (LEHNER et al., 2005).

Têm sido demonstrado que os microrganismos em biofilmes são mais resistentes aos antibióticos e sanificantes do que as células planctônicas. A sua resistência depende da sua atividade metabólica e aumenta com a idade do biofilme. A resistência a agentes antimicrobianos exibida pelo biofilme está relacionada com sua estrutura tridimensional e pode ser reduzida com a destruição da mesma (POULSEN, 1999). A resistência também é atribuída a fatores como neutralização de antimicrobianos pela matriz polimérica, baixa taxa de crescimento e aquisição de genes que conferem resistência (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003).

A habilidade de erradicar bactérias em biofilmes de superfícies industriais é significativamente menor do que a habilidade de destruir bactérias planctônicas. Desse modo, tem sido relatado que a resistência das populações bacterianas a antibióticos e biocidas é de 100-1000 vezes maior do que populações equivalentes de bactéria planctônicas. Isto significa que além de serem encontrados com frequência, os biofilmes são de difícil destruição (GILBERT, ALLISON; MCBAIN, 2002).

2.5.1 Resistência conferida pela matriz polimérica

A formação de biofilmes pode ser descrita como um processo de três etapas: desenvolvimento de um filme de condicionamento, colonização primária e desenvolvimento de um biofilme maduro, com células bacterianas associadas a uma matriz de polímeros extracelulares e outros detritos (MITTELMAN, 1998). A matriz de polímeros extracelulares, também conhecida como glicocálix, é composta de homo e heteropolissacarídeos formados particularmente de glucose, manose, galactose, piruvato e complexos de ácido manurônico ou ácido glucurônico (LINDSAY; VON HOLY, 2006). Além de polissacarídeos, a matriz também é composta de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (XAVIER et al., 2005).

A produção de polímeros extracelulares pelas bactérias nos biofilmes possui muitas funções, entre elas o condicionamento inicial da superfície para facilitar a aderência bacteriana, formação e manutenção de micro-colônias e conferência de resistência intensificada das bactérias ao estresse ambiental e aos agentes antimicrobianos (POULSEN, 1999). A estrutura da matriz de polímeros extracelulares confere às bactérias do interior dos biofilmes proteção contra uma ampla série de agentes antimicrobianos (MITTELMAN, 1998).

Um dos mecanismos propostos para explicar a resistência seria que o glicocálix poderia criar uma barreira de difusão ao agente antimicrobiano. A difusão através do biofilme poderia ser afetada por interações de carga entre o glicocálix e o agente antimicrobiano, pelo aumento da distância que o agente deve percorrer, por exclusão molecular e pela viscosidade do glicocálix. Também foi sugerido que um biofilme com uma densa camada de glicocálix deveria estar saturado com o agente antimicrobiano para que a bactéria seja destruída. Outro possível mecanismo seria que a matriz polimérica do biofilme reage e neutraliza os agentes antimicrobianos. As pesquisas sugerem que o iodo reage com os compostos da matriz, tendo em vista que a interação do iodo com moléculas orgânicas, como proteínas, ácidos graxos, compostos de sulfidril e vitamina C já foi relatada. Estas interações envolveriam a oxidação das moléculas orgânicas pelo iodo. Também foi demonstrado que interações químicas entre o cloro e o glicocálix de biofilmes ocorrem e que o material do glicocálix produz uma demanda de cloro (CLOETE, 2003).

Biofilmes estáveis foram expostos a concentrações crescentes de hipoclorito de sódio (200, 500 e 1000 mg de cloro livre /L por 20 minutos). Uma redução de 2 ciclos logarítmicos nas contagens bacterianas foi atingida somente com exposição a 1000 mg de cloro livre /L. Numa cultura planctônica 100% dos microrganismos foram destruídos quando expostos a 10 mg de cloro livre /L por 30 segundos (NORWOOD; GILMOUR, 2000). Linhagens endêmicas de *Staphylococcus aureus* isoladas de equipamentos utilizados no processamento de aves eram oito vezes mais resistentes ao cloro do que linhagens de *S. aureus* isoladas de pele saudável. A grande diferença fenotípica entre estas linhagens era a extensa matriz polimérica associada com o equipamento (MITTELMAN, 1998).

Inúmeros estudos evidenciaram que biofilmes associados com polímeros extracelulares podem não ser efetivamente removidos por procedimentos normais de limpeza. Os processos de limpeza efetivos para a remoção de resíduos de alimentos não são necessariamente eficazes na

remoção de biofilmes, em função das propriedades químicas dos polímeros da matriz, que diferem das propriedades das gorduras e proteínas alvos do processo de limpeza (ANTONIOU; FRANK, 2005). Por exemplo, isolados de *B. cereus* associados com laticínios produzem proteínas únicas, durante a aderência às superfícies, não encontradas em células planctônicas (LINDSAY; VON HOLY, 2006). Agentes alcalinos, que agem pela hidrólise e dissolução de matéria orgânica, deveriam ser capazes de remover os exopolímeros dos biofilmes, mas as condições de exposição exigidas para a remoção eficaz destes podem diferir daquelas determinadas para resíduos de proteínas e lipídios (ANTONIOU; FRANK, 2005).

2.5.2 Adaptação das células dos biofilmes aos agentes antimicrobianos

A preocupação com a produção de alimentos mais seguros e com o aumento da vida útil dos produtos tem levado ao uso mais freqüente da sanificação química (LANGSRUD et al., 2003). No entanto, se agentes antimicrobianos e sanificantes tem o intuito de ter um papel significativo no controle eficaz de patógenos de origem alimentar, os fabricantes de alimentos devem saber mais sobre o potencial de desenvolvimento de resistência entre os microrganismos alvos (DAVIDSON; HARRISON, 2002). Estudos recentes têm indicado que o uso de determinados sanificantes tem forçado uma pressão seletiva e contribuído para a emergência de microrganismos resistentes a estes compostos em ambientes relacionados a alimentos. A resistência combinada a sanificantes e a outros tipos de agentes antimicrobianos pode se tornar um grande desafio no futuro, para as indústrias processadoras de alimentos. Resistência combinada a sanificantes e antibióticos poderia levar a sérias conseqüências para a saúde pública (LANGSRUD et al., 2003).

O uso de sanificantes pode levar a seleção de linhagens de bactérias intrinsecamente resistentes ao agente antibacteriano aplicado. Inúmeros relatos indicam que a exposição bacteriana a concentrações subletais de sanificantes pode ter como conseqüência um aumento de resistência (LANGSRUD et al., 2003). Após a exposição regular a ação dos sanificantes, bactérias Gram positivas, como *S. aureus*, demonstraram adaptação e tolerância à estes compostos químicos. As bactérias Gram negativas, como *Pseudomonas* spp., também podem se adaptar aos sanitizantes utilizados nas plantas de processamento de alimentos (TO et al., 2002). Em um estudo realizado com *Listeria monocytogenes*, esta exibiu resistência adquirida a concentrações subletais de cloreto de benzalcônico (CB), um composto de quaternário de

amônio. O grau de adaptação foi confirmado com testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) (TO et al., 2002).

Nas indústrias, a adaptação pode ocorrer em nichos com enxágüe deficiente, que deixa baixas concentrações de sanificantes nas superfícies (LANGSRUD et al., 2003). O desenvolvimento de suscetibilidade reduzida nesta população seja por adaptação fenotípica, alteração genética ou aquisição genética, aumenta a probabilidade de uma posterior falha na sanitificação, tendo como conseqüências sérios problemas na preparação industrial de alimentos e na área da saúde humana (CHAPMAN, 2003).

Alguns microrganismos, como esporos bacterianos e *Cryptosporidium*, possuem uma resistência natural ao cloro e alguns microrganismos também podem desenvolver uma resistência adquirida frente a uma exposição a este composto. As condições que podem levar ao desenvolvimento de resistência incluem a aplicação de concentrações subletais de cloro administradas por erro ou a neutralização do composto durante o uso. Por exemplo, a atividade antimicrobiana dos hipocloritos é significativamente reduzida pelo material orgânico e pH alcalino (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Apesar dos dados serem escassos, é possível que a resistência a sanificantes dos microrganismos de um biofilme também pode ser conseqüência da exposição a doses subletais destes compostos (DAVIDSON; HARRISON, 2002). Consequentemente, biofilmes podem representar um reservatório para a disseminação de genes resistentes a agentes antimicrobianos (LINDSAY; VON HOLY, 2006). Não há evidências que o uso apropriado de sanificantes nos equipamentos utilizados no processamento de alimentos irá desencadear o desenvolvimento de microrganismos resistentes. No entanto, com o aumento da confiança no uso de sanificantes nos equipamentos, nos ambientes de processamento de alimentos e em produtos crus, o potencial de surgimento de tais microrganismos resistentes existe de fato. Portanto, o potencial de desenvolvimento de linhagens resistentes deve continuar a ser investigado (DAVIDSON; HARRISON, 2002). Apesar da base da resistência bacteriana a antibióticos ser bastante conhecida, a resistência a antissépticos, sanificantes e conservantes de alimentos, é pouco conhecida (CLOETE, 2003).

2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de um agente antimicrobiano

O principal propósito da sanificação é a eliminação do risco de contaminação ou infecção. Como consequência, a intenção de testar sanificantes é verificar se estes produtos estão atingindo seus objetivos, ou seja, a eliminação de microrganismos (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1992).

Inúmeros fatores podem afetar a eficiência de um sanificante na prática, como o tipo e a natureza das superfícies utilizadas, concentração e natureza dos resíduos aderidos, o tipo de microbiota contaminante da superfície e a concentração e o período de contato do sanificante com a superfície. A utilização do produto apropriado é um dos fatores mais importantes numa operação de higienização, portanto, é importante o conhecimento das condições de desempenho do sanificante utilizado. Dessa forma, tornam-se necessários alguns testes que comprovem a eficiência dos produtos utilizados (OKAZAKI, 2003).

A atividade bacteriostática de um sanificante é determinada pela avaliação da concentração mínima inibitória (CIM). Este é o método mais simples para medir a inibição do crescimento bacteriano. O sanificante é misturado a um caldo nutriente em concentrações decrescentes, os tubos são inoculados com a cultura bacteriana a ser testada e após um período adequado de incubação, a menor concentração que inibir o crescimento bacteriano, é o valor de CIM. É importante garantir a ausência de qualquer antagonista (neutralizantes) que possa inibir a atividade bacteriostática do sanificante ou seus resíduos na subcultura. Estes testes são raramente utilizados para a avaliação de sanificantes, no entanto são reconhecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e utilizados para determinar a eficácia de um neutralizante em testes bactericidas e para a seleção dos organismos testes mais resistentes para sua inclusão em testes de capacidade, segundo Russell, Hugo e Ayliffe (1992).

O método CIM permite comparações entre microrganismos expostos ao mesmo agente químico, mas não a comparação entre as atividades de sanificantes. A adição de matéria orgânica, na forma de albumina de soro bovino representado pelo Tryptic Soy Broth (TSB), à suspensão bacteriana é recomendada como um desafio ao sanificante. A limitação do método CIM é o efeito não conhecido do caldo nutriente em cada sanificante, ainda que, a diluição sequencial realizada na mistura parece superar a interferência do caldo (PENNA; MAZZOLA; MARTINS, 2001). Uma vantagem do CIM é que este é um teste de fácil execução (LANGSRUD et al., 2003).

3 METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Higiene e Laticínios, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). Todas as etapas do experimento e análises microbiológicas foram conduzidas em Cabine de Segurança Biológica (PACHANE®) Classe II tipo A1 com 70% de recirculação e 30% de renovação de ar servido através de um filtro HEPA para o ambiente. Os béqueres, pipetas, pinças e grades de aço inoxidável utilizados foram esterilizados em estufa a 160°C por 2 horas. Foram utilizadas placas de Petri descartáveis estéreis.

3.1 Avaliação da resistência das células vegetativas de *B. cereus* em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios

3.1.1 Obtenção e identificação de células de *B. cereus*

A cepa de *B. cereus* utilizada nos experimentos foi adquirida da coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Laticínios da ESALQ. A cultura foi recebida em Ágar Nutriente e reativada pela passagem por duas vezes consecutivas em tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), incubados em estufa a 35°C por 24 horas. O inóculo dos tubos com crescimento foi estriado em placas previamente preparadas contendo o meio seletivo diferencial para isolamento de *B. cereus*, Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP-A). As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD a 30°C por 24 horas.

Após o crescimento, foram selecionadas colônias típicas isoladas de *B. cereus* (róseas leitosas, esféricas, com bordas perfeitas, planas, secas e cerosas, rodeadas por um halo típico de precipitação). Através de uma agulha microbiológica flambada, fez-se a transferência destas colônias para tubos de Ágar Nutriente inclinado. Estes foram incubados em estufa BOD a 30°C por 24 horas, para obtenção do inóculo a ser utilizado nos testes de confirmação (DOWNES; ITO, 2001).

Para a confirmação, foram realizadas as seguintes provas, de acordo com Downes e Ito (2001):

- Coloração de Gram;
- Provas bioquímicas:

- Teste de utilização anaeróbia da glucose: foi utilizado meio Caldo Vermelho de Fenol 1% glucose, previamente desaerado por fervura, incubado a 35°C por 24 horas.
- Teste da decomposição da tirosina: foi utilizado meio Ágar Tirosina inclinado incubado a 35°C, por até 72 horas.
- Teste de Voges-Proskauer: foi utilizado meio Caldo VP incubado a 35°C por 48 horas.
- Teste de redução do nitrato: foi utilizado meio Caldo Nitrato incubado a 35°C por 24 horas.
- Teste de hidrólise da gelatina: foi utilizado meio Ágar Gelatina incubado a 35°C por 24 horas.
- Coloração de cristais de toxinas intracelulares: foi utilizado meio Ágar Nutriente inclinado incubado a 30°C por 24 horas.
- Teste de motilidade: foi utilizado meio Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) incubado a 30°C por 24 horas.
- Verificação de crescimento de rizóide: foi utilizado meio Ágar Nutriente incubado a 30°C por 24-48 horas.

A cultura foi caracterizada como *B. cereus* pelas seguintes características: bastonetes curtos Gram-positivos; utilização da glucose; motilidade; decomposição da tirosina; VP positivo, redução de nitrato; hidrólise da gelatina; produção de cristais negativa e crescimento de rizóides negativo.

A partir das colônias confirmadas, foram preparadas culturas estoques para uso nos experimentos. A cultura foi estriada em superfície inclinada de tubos com Ágar Nutriente incubados a 30°C por 24 horas. Após a incubação, a superfície dos tubos foi coberta com vaselina estéril e os tubos mantidos em refrigeração a 4°C.

3.1.2 Obtenção da suspensão padronizada de células vegetativas

A densidade da suspensão foi ajustada a um padrão McFarland de 0,5. A turbidez correta do padrão, preparado com sulfato de bário (BaSO_4), foi verificada usando um espectrofotômetro, tendo a absorbância em 625nm variando de 0,08 a 0,10. As suspensões de BaSO_4 foram transferidas, em alíquotas de 4 a 6mL, para tubos com tampas de rosca e armazenados em local escuro (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS/NCCLS, 2003).

Os microrganismos estocados em Ágar Nutriente foram reativados em Caldo BHI com incubação a 35°C por 24 horas. O inóculo dos tubos com crescimento foi estriado em placas previamente preparadas de Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI-A). As placas foram incubadas

invertidas em estufa BOD a 35°C por 24 horas. Foram selecionadas colônias isoladas e a partir destas foi realizada uma coloração de Gram para verificar a pureza da cultura. Sendo o resultado bastonetes curtos Gram positivos, estas colônias foram utilizadas para o preparo de uma suspensão padronizada do microrganismo.

Foram preparadas suspensões diretas das colônias em Solução Salina 0,85% e estas foram ajustadas conforme o padrão McFarland de 0,5. Isto resultou em uma suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC de *B. cereus* /mL, cujo ajuste foi feito pela comparação com o padrão McFarland contra um cartão de fundo branco e linhas contrastantes pretas, em ambiente de luz intensa (NCCLS, 2003; PEDRINI; MARGATHO, 2003; SILVA et al., 2002). A contagem de células nas suspensões foi aferida pela técnica do plaqueamento em profundidade em Ágar Nutriente, com incubação a 30°C por 24 horas, sendo confirmada a população de 10^8 UFC/mL.

3.1.3 Desenvolvimento do biofilme com células vegetativas de *B. cereus*

Os biofilmes foram desenvolvidos em cupons de aço inoxidável, tipo 304, com dimensão de 50 x 20 mm. Cada cupom possui uma superfície com polimento sanitário, sendo esta utilizada para desenvolvimento do biofilme. Na extremidade de cada cupom foi feito um orifício, para passagem de anzol de aço inoxidável unido a arame confeccionado de aço inoxidável.

3.1.3.1 Preparo dos cupons de aço inoxidável

Os materiais utilizados (cupons, arames e anzóis) foram previamente higienizados da seguinte maneira: imersão em solução de hidróxido de sódio a 1% durante 30 minutos; enxágüe em água destilada; imersão em álcool 70%; enxágüe em água destilada. A secagem foi realizada em estufa a 35°C e cada cupom e cada conjunto arame e anzol, foram esterilizados em embalagem de papel individual, a 121 °C por 15 minutos em autoclave (RIBEIRO-FURTINI, 2005).

3.1.3.2 Condicionamento da superfície dos cupons

Com o objetivo de obter uma superfície de aço inoxidável coberta por um filme de condicionamento semelhante ao encontrado em ambiente industrial, os cupons foram imersos durante uma hora em leite UHT à temperatura ambiente em Cabine de Segurança Biológica. Logo em seguida, foram secos em estufa a 25°C por 24 horas, acondicionados individualmente em

placas de Petri estéreis forradas com papel de filtro, com a superfície de polimento sanitário voltada para cima, conforme a Figura 2:

Figura 2 - Cupons de aço inoxidável utilizados no experimento

3.1.3.3 Adesão das células vegetativas de *B. cereus* aos cupons de aço inoxidável

Em um béquer de vidro de 2.000mL, foi acoplada uma grade de aço inoxidável, onde, com o auxílio de uma pinça, foram pendurados pelo conjunto arame e anzol, 18 cupons de aço inoxidável, previamente preparados como descrito nos itens 3.1.3.1 e 3.1.3.2. Um volume de 1800mL de leite UHT foi acrescentado ao béquer, de maneira que os cupons permanecessem submersos (RIBEIRO-FURTINI, 2005).

O conteúdo do béquer foi agitado com auxílio de agitador magnético (VEP CIENTÍFICA®) dotado de aquecimento. Quando a temperatura do leite, aferida por termômetro digital posicionado no centro geométrico do béquer, se estabilizou em 30°C, foi adicionada a suspensão padronizada de células, conforme a Figura 3.

Anteriormente a execução das três repetições propostas no projeto, foi realizado um teste preliminar, no qual foi adicionado aos 1800mL de leite UHT 1mL da suspensão padronizada de *B. cereus* contendo 10^8 UFC/mL. O conjunto permaneceu sob agitação nestas condições por 6 horas, no entanto, este tempo de contato não foi suficiente para obtenção dos resultados esperados, pois houve uma baixa taxa de aderência de células à superfície dos cupons, insuficiente para avaliação da higienização. Portanto, nos testes definitivos o conjunto permaneceu sob agitação por 10 horas e foi adicionado 10mL da suspensão padronizada de *B. cereus* contendo 10^8 UFC/mL em 1800mL de leite UHT. Foi realizada a quantificação da

contaminação presente no volume de leite antes da inoculação de *B. cereus* e após 10 horas da adição da suspensão padronizada, utilizando a metodologia de plaqueamento em profundidade em Ágar Nutriente, com placas em duplicata, descrita por Downes e Ito (2001). Os valores encontrados foram <10 e $3,7 \times 10^6$ UFC/mL de leite, respectivamente.

Após o tempo determinado, os cupons foram retirados com o auxílio de pinças e secos em estufa BOD a 30°C por 24 horas, acondicionados individualmente em placas de Petri forradas com papel de filtro, com a superfície de polimento sanitário voltada para cima (MARQUES, 2005; RIBEIRO-FURTINI, 2005).

Figura 3 - Adesão das células aos cupons de aço inoxidável

3.1.3.4 Avaliação da adesão nos cupons de aço inoxidável

Para avaliação da adesão, foi utilizada a técnica do esfregaço em superfície com *swabs* padronizados estéreis, conforme a Figura 4. Após o tempo estabelecido para a secagem do biofilme, os cupons tiveram a superfície a ser amostrada lavada com Tampão Fosfato pH 7,2 (PB) para a remoção de células não aderidas.

Seis cupons identificados como controle, tiveram a superfície amostrada por *swabs* umedecidos com Água Salina Peptonada Tween 80 (H₂Osp-TWEEN). Os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL do mesmo diluente e o conteúdo destes foi homogeneizado em agitador de tubos durante 30 segundos. Das suspensões contendo os *swabs*,

consideradas amostras sem diluição (10^0), foram retiradas alíquotas para preparo das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em tubos contendo 9mL de Água Salina Peptonada (H₂Osp).

Para quantificação foi utilizada a técnica do plaqueamento em profundidade em Ágar Nutriente, com placas em triplicata, incubadas em estufa BOD a 30°C por 48 horas. Após a contagem das colônias, foi determinado o número de UFC/cm² (DOWNES; ITO, 2001; MARQUES, 2005; RIBEIRO-FURTINI, 2005).

De acordo com Silva et al., (2007), os resultados para amostras preparadas pela técnica do esfregaço em superfície, devem ser expressos em UFC por cm² da amostra. Inicialmente, foi calculado o número de UFC por mililitro do diluente onde foram recolhidos os *swabs* e em seguida a contagem foi convertida para UFC/cm² da amostra através da Fórmula 1:

$$\text{UFC/cm}^2 = \text{UFC/mL da suspensão} \times \frac{\text{Área amostrada}}{\text{Volume de diluente da coleta}} \quad (1)$$

A superfície amostrada em cada cupom possui área de 10cm². Após a amostragem, os *swabs* foram transferidos para tubos contendo 10mL de diluente. Portanto, neste caso, de acordo com a fórmula, o valor de UFC/mL calculado, é equivalente ao valor de UFC/cm².

Figura 4 - Técnica do esfregaço em superfície aplicada aos cupons de aço inoxidável

3.1.4 Procedimento de higienização dos cupons com biofilmes de células vegetativas

Os 12 cupons restantes com adesão bacteriana foram submetidos ao procedimento de higienização. Foram preparados sete béqueres contendo as devidas soluções ou águas de enxágüe utilizadas em procedimento de higienização por CIP em laticínios (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS, 1985; PENG; TSAI; CHOU, 2002).

Os cupons de aço inoxidável foram unidos a uma grade de aço inoxidável como descrito anteriormente. A grade de aço inoxidável foi passada de recipiente em recipiente seguindo os tempos de contato estabelecidos, de acordo com as Figuras 5 e 6 (GÂNDARA; OLIVEIRA, 2000; RIBEIRO-FURTINI, 2005):

- **Béquer nº1:** água destilada morna a 30°C/ um minuto sob agitação.
- **Béquer nº2:** solução de detergente alcalino (ALCA CF – SANI QUÍMICA[®]) à base de agente alcalinizante a 70°C com concentração determinada pelo fabricante/ sete minutos, sob agitação.
- **Béquer nº3:** água destilada a temperatura ambiente/ um minuto, sob agitação.
- **Béquer nº4:** solução de detergente ácido (ACID CF – SANI QUÍMICA[®]) à base de ácido inorgânico com concentração determinada pelo fabricante à temperatura ambiente/ três minutos, sob agitação.
- **Béquer nº5:** água destilada a temperatura ambiente/ um minuto, sob agitação.
- **Béquer nº6:** solução de sanificante a base de quaternário de amônio (QUATERCAP DM-50 - cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio - BIOSAN[®]) com concentração de 1,2% à temperatura ambiente, como determinado pelo fabricante/ dez minutos, sob agitação.
- **Béquer nº7:** água destilada a temperatura ambiente/ um minuto, sob agitação.

Para agitação das soluções, os béqueres foram colocados sobre agitadores magnéticos (VEP CIENTÍFICA[®]) com barras magnéticas. A temperatura das soluções aquecidas foi aferida por termômetros digitais. Água destilada estéril foi utilizada no preparo das soluções e águas de enxágüe. As soluções foram preparadas com a utilização de vidraria volumétrica.

Após a passagem da grade pelo béquer nº5, seis cupons foram retirados do conjunto e submetidos à técnica do esfregaço em superfície para a determinação do número de células aderidas após o processo de limpeza. Os seis cupons restantes foram submetidos à etapa adicional

de sanificação e em seguida também foram submetidos à técnica do esfregaço em superfície para avaliação do efeito da sanificação nas células aderidas. As Figuras 5 e 6 ilustram o processo:

Figura 5 - Procedimento de higienização por CIP

Figura 6 – Procedimento de limpeza e sanificação dos cupons de aço inoxidável

3.1.5 Avaliação da adesão nos cupons de aço inoxidável após a higienização

Foi utilizada a técnica do esfregaço em superfície. Os seis cupons submetidos apenas à limpeza tiveram sua superfície amostrada por *swabs* padronizados estéreis umedecidos com H₂Osp-TWEEN. Os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL do mesmo diluente e o conteúdo destes foi homogeneizado em agitador de tubos durante 30 segundos. Das suspensões contendo os *swabs*, consideradas amostras sem diluição (10^0), foram retiradas alíquotas para preparo das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em tubos contendo 9mL de H₂Osp. A quantificação foi feita em Ágar Nutriente, de acordo com o item 3.1.3.4 (DOWNES; ITO, 2001). Para avaliação da adesão nos seis cupons de aço inoxidável submetidos à limpeza e sanificação foi realizado o mesmo procedimento, no entanto, os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de solução neutralizante, composta por 2% de lecitina, 2% de Tween 80 e 0,5% de tiosulfato de sódio, dissolvidos em água destilada (OKAZAKI, 2003).

3.2 Avaliação da resistência de esporos de *B. cereus* em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios

3.2.1 Obtenção e padronização dos esporos

Imediatamente antes da utilização nos experimentos, a cultura estoque de células vegetativas de *B. cereus* foi reativada três vezes consecutivas em Ágar Nutriente inclinado, incubado a 30°C por 24 horas. Após isto, foi obtida uma suspensão de células vegetativas, pela adição de água destilada estéril e agitação manual. Em seguida, 1,0mL desta suspensão foi inoculado em garrafa de Roux previamente preparada contendo meio de esporulação solidificado, constituído de 3g de extrato de carne, 5g de triptona, 1g de amido, 10mg de sulfato de manganês e 20g de ágar, diluídos em 1000mL de água destilada (MORAES, 1996).

Após incubação, foram adicionados 20mL de água destilada e pérolas de vidro esterilizadas sobre a superfície do meio de cultura da garrafa de Roux. Esta foi agitada manualmente e o sobrenadante coletado em três tubos de centrifuga estéreis. Cada tubo recebeu 5mL de suspensão. Após a centrifugação (centrífuga FANEM 204-N), a 5000rpm por 15 minutos, o sobrenadante de cada tubo foi descartado e os esporos ressuspensos em 3mL água destilada estéril, com agitação manual. O conteúdo dos três tubos foi reunido em um único tubo, com adição de 1mL água destilada estéril. Após centrifugação a 5000rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, os

esporos foram ressuspensos em 11mL de água destilada estéril e armazenados a 4°C até o uso (LINDSAY; BRÖZEL; VON HOLY, 2006; MORAES, 1996).

Anteriormente a execução das três repetições propostas no projeto, foi realizado um teste preliminar, no qual as garrafas de Roux utilizadas para o cultivo de esporos foram incubadas a 30°C por 4 dias. Após a aplicação da técnica do plaqueamento em profundidade em Ágar Nutriente descrita por Downes e Ito (2001), para confirmação do número de esporos/mL nas suspensões padronizadas preparadas, verificou-se que apenas uma suspensão atingiu a ordem de 10^8 esporos/mL. Para obtenção de melhores resultados, nos testes definitivos, prolongou-se a incubação das garrafas de Roux por 6 dias a 30°C.

Para aferir o número de esporos/mL das suspensões realizou-se uma diluição decimal a partir da própria suspensão, que foi submetida a choque térmico após aquecimento a 80°C, durante 10 minutos para eliminação de qualquer forma vegetativa e ativação da germinação de esporos. Para quantificação foi utilizada a técnica do plaqueamento em profundidade em Ágar Nutriente, com placas em duplicata. Após incubação em estufa BOD a 30°C por 48 horas determinou-se o número de UFC/mL das suspensões (MORAES, 1996; SILVA et al., 2007).

Verificou-se a ausência de células vegetativas em cada suspensão estoque de esporos pela técnica de coloração de esporos Wirtz-Conklin. Esta técnica utiliza uma solução de corante verde malaquita 5% e uma contracorante de safranina a 0,5%, que cora outras estruturas em rosa, facilitando a diferenciação dos esporos, corados de verde intenso (DOWNES; ITO, 2001).

3.2.2 Desenvolvimento do biofilme com esporos de *B. cereus*

Os biofilmes foram desenvolvidos em cupons de aço inoxidável, tipo 304, com polimento sanitário, de dimensão 50 x 20 mm. Os cupons foram preparados como descrito nos itens 3.1.3.1 e 3.1.3.2.

Para o desenvolvimento do biofilme com esporos foi repetido o mesmo procedimento descrito no item 3.1.3.3, porém, foi adicionada aos 1800mL de leite UHT, o conteúdo de um tubo preparado no item 3.2.1, contendo 10mL da suspensão de esporos de *B. cereus* com população padronizada de aproximadamente 10^8 esporos/mL.

3.2.2.1 Avaliação da adesão de esporos nos cupons de aço inoxidável

Empregou-se o procedimento descrito no item 3.1.3.4, com amostragem da superfície de 6 cupons, identificados como controle. No entanto, as diluições seriadas foram submetidas a choque térmico após aquecimento a 80°C, durante 10 minutos para eliminação de formas vegetativas e ativação da germinação dos esporos, anteriormente ao plaqueamento em profundidade em Ágar Nutriente, com placas em triplicata e incubação a 30° por 48 horas em estufa BOD, para determinação do UFC/cm².

3.2.3 Procedimento de higienização dos cupons com biofilmes de esporos

O procedimento simulado de higienização foi realizado como descrito no item 3.1.4.

3.2.4 Avaliação da adesão de esporos nos cupons de aço inoxidável após a higienização

Empregou-se o procedimento descrito no item 3.1.5. No entanto, as diluições seriadas foram submetidas a choque térmico com aquecimento a 80°C, durante 10 minutos anteriormente ao plaqueamento em profundidade em Ágar Nutriente, com placas em triplicata e incubação a 30° por 48 horas em estufa BOD, para determinação do UFC/cm².

3.3 Exposição das células vegetativas de *B. cereus* a doses subletais do sanificante, para avaliação da aquisição de resistência.

3.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima foi determinada utilizando-se o método de diluição em caldo, que mede quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Para realizar o teste, preparam-se tubos de ensaio com meio de cultura aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos são inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado e após incubação de 24 horas, é feita a comparação visual dos tubos. A CIM, neste caso, é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo (NCCLS, 2003).

Para determinação da CIM, foram utilizadas séries de tubos de ensaio com rosca. No preparo de cada série, composta por doze tubos numerados (1 a 12), seguiu-se o procedimento:

Foi feita a distribuição de 5mL de meio de cultura, Tryptic Soy Broth (TSB) para cada tubo, exceto para o primeiro. Os tubos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Para a obtenção de concentrações decrescentes de sanificante, foi adicionado 10mL de solução de sanificante no primeiro tubo (tubo vazio), dos quais 5mL foram transferidos para o segundo tubo, que continha 5mL de caldo TSB. Após a homogeneização do conteúdo em agitador de tubos, o procedimento foi repetido sucessivamente até o tubo de número 11. Deste modo, foram obtidas as seguintes concentrações de solução de sanificante nos tubos: 100% (tubo 1); 50% (tubo 2); 25% (tubo 3); 12,5% (tubo 4); 6,25% (tubo 5); 3,12% (tubo 6); 1,56% (tubo 7); 0,78% (tubo 8); 0,39% (tubo 9) e 0,19% (tubo 10).

Após a realização da diluição, a suspensão padronizada do inóculo foi adicionada, em um volume de 0,1mL, para todos os tubos, exceto para o de número 11. O tubo de número 11 é considerado o controle negativo (TSB + antimicrobiano) e o tubo de número 12 o controle positivo (TSB + inóculo). O conteúdo foi homogeneizado e os tubos incubados em estufa BOD a 30°C por 24 horas, para comparação visual. A CIM do antimicrobiano testado é considerada como a concentração do tubo de maior diluição onde se verificou a ausência de crescimento bacteriano (MARTINS, 2002; PACHECO, 2003; PENNA; MAZZOLA; MARTINS, 2001).

Figura 7 - Série composta por doze tubos do método de diluição em caldo

Neste experimento, foram preparadas soluções do QUATERCAP DM-50 (BIOSAN[®]) na faixa de concentração prevista pelo fabricante (0,1 a 3%). Foram preparadas soluções nas

seguintes concentrações: 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9%; 1%; 2% e 3%. Cada uma das soluções preparadas foi testada em uma série de doze tubos, em duplicata, para seleção da melhor concentração para determinação da CIM.

Após um primeiro teste, utilizando estas soluções, foi realizado um segundo teste, onde foram aplicadas as soluções que apresentaram os melhores resultados e uma solução adicional, de concentração 0,05%, para comparação de dados. Todas as soluções foram preparadas com a utilização de vidraria volumétrica e água destilada estéril.

O inóculo padrão para os testes foi obtido de acordo com o item 3.1.2, com o preparo de uma suspensão contendo aproximadamente de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL de *B. cereus*.

3.3.2 Exposição das células vegetativas a concentrações subletais do sanificante

Após a determinação da CIM, a resistência da cepa de *B. cereus* foi gradualmente intensificada através do crescimento em concentrações subletais do sanificante (TO et al., 2002). A cultura foi inoculada em tubo de TSB contendo concentração subletal do sanificante, incubado a 30°C. A cada 24 horas a cultura foi transferida com o auxílio de uma alça microbiológica para um novo tubo de TSB contendo a mesma concentração de sanificante do tubo anterior. Este procedimento foi repetido durante 28 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.3 Verificação da aquisição de resistência pela cepa de *B. cereus*

A aquisição de resistência foi verificada pela aferição da CIM a cada 7 dias e pela comparação do valor obtido com o valor da CIM inicial. Com o auxílio de uma alça microbiológica, a cultura em concentração subletal foi transferida para TSA adicionado de sanificante, com incubação a 30°C por 24 horas, para obtenção do inóculo para o teste de CIM. O inóculo foi utilizado para preparo de suspensão células, contendo aproximadamente de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL de *B. cereus*, pelo padrão da escala McFarland. A suspensão foi submetida ao teste CIM, com série de doze tubos em duplicata, incubado a 30°C por 24 horas. A Figura 8 ilustra o procedimento:

Figura 8 - Procedimento para verificação da aquisição de resistência pelo aumento da CIM

Após 21 dias de exposição a concentrações subletais foi realizada uma alteração no procedimento de obtenção do inóculo para o teste de CIM. Com o auxílio de uma alça microbiológica, a cultura em concentração subletal foi transferida para TSA adicionado de sanificante e também para TSA sem sanificante, com o propósito de recuperar a injúria da cultura, propiciando assim o crescimento em concentrações inicialmente letais no teste CIM. Após incubação a 30°C por 24 horas o inóculo de cada placa foi utilizado para preparo de uma suspensão de células pelo padrão da escala McFarland. Cada suspensão foi individualmente submetida a um teste CIM, com série de doze tubos em duplicata, incubado a 30°C por 72 horas. Após 28 dias, foi repetido o mesmo procedimento. A Figura 9 ilustra o procedimento:

Figura 9 - Procedimento para verificação da aquisição de resistência pelo aumento da CIM, após 21 e 28 dias de exposição a concentrações subletais

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da resistência das células vegetativas de *B. cereus* em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios

4.1.1 Avaliação da adesão nos cupons de aço inoxidável

A Tabela 2 mostra as contagens de células vegetativas aderidas aos cupons de aço inoxidável nas quatro repetições realizadas:

Tabela 2 – Contagens de células vegetativas de *B. cereus* nos cupons controle nas quatro repetições realizadas

R ^a	Contagens (UFC/cm ²)/cupom						Média (UFC/cm ²)	Desvio padrão
	1	2	3	4	5	6		
1	NC ^b	2,3 x 10 ⁵	3,7 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	5,2 x 10 ⁵	444825,8
2	1,0 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³	5,2 x 10 ³	1,0 x 10 ⁵	NC ^b	2,8 x 10 ⁴	40996,6
3	8,0 x 10 ³	1,2 x 10 ³	2,4 x 10 ³	8,7 x 10 ³	2,1 x 10 ³	2,3 x 10 ⁴	7,5 x 10 ³	8206,9
4	1,3 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	2,6 x 10 ⁴	3,2 x 10 ⁴	3,4 x 10 ³	3,6 x 10 ⁴	46854,0

^a Repetições

^b Cupom não considerado

Nas quatro repetições realizadas, as células vegetativas de *B. cereus* apresentaram adesão média de 5,2 x 10⁵; 2,8 x 10⁴; 7,5 x 10³ e 3,6 x 10⁴ UFC/cm², respectivamente, após tempo de contato de 10 horas com a superfície de aço inoxidável (tipo 304) com filme de condicionamento e 24 horas de incubação dos cupons a 30°C.

A adesão de células bacterianas depende de fatores como morfologia das células (motilidade, pili, flagelo, frimbria) e propriedades físicas e químicas da superfície de contato. Superfícies consideradas hidrofílicas, como o aço inoxidável, permitem que a adesão ocorra mais facilmente do que em superfícies hidrofóbicas, como borracha. A revisão realizada por Chmielewski e Frank (2003) indicou que a presença de uma camada de matéria orgânica sobre a superfície pode promover a adesão bacteriana.

Peng, Tsai e Chou (2002) também verificaram o processo de adesão de *B. cereus* em cupons de aço inoxidável tipo 304 com filme de condicionamento de leite. Os cupons foram imersos por

4 horas em meio previamente inoculado com *B. cereus* e incubado a 30°C por 24 horas. Após 8 dias de incubação dos cupons, a adesão média obtida nos cupons variou entre $1,2 \times 10^3$ a $1,2 \times 10^6$ UCF/cm².

O tempo de contato entre as células e a superfície de contato, também exercem influência na adesão bacteriana. De acordo com Chmielewski e Frank (2003) estudos indicam que a adesão irreversível a superfícies ocorre entre 20 minutos a no máximo 4 horas de contato. A remoção destas células requer a aplicação de força física, produtos químicos ou calor.

Em ensaio preliminar realizado no presente estudo, o tempo de contato de 6 horas resultou em adesão média de $1,0 \times 10^3$ UFC/cm², contra $1,4 \times 10^5$ UFC/cm² após 10 horas. Em estudo realizado por Gândara e Oliveira (2000) o tempo de contato também demonstrou influência sobre a adesão de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável tipo 316. Para adesão das células bacterianas, placas de aço inoxidável foram submersas em 1500mL de leite adicionado de 10^2 UFC /mL. O conjunto permaneceu sob agitação a 45°C. Após 3 horas, a adesão média obtida em aço inoxidável foi de $1,6 \times 10^1$ UCF/cm² e após 6 horas de $1,9 \times 10^4$ UCF/cm².

De acordo com Ribeiro-Furtini (2005) características individuais dos microrganismos podem influenciar na adesão. Em seu estudo, verificou o processo de adesão de *Pseudomonas* spp mesófila e psicrotrófica em aço inoxidável tipo 304. Para a cepa psicrotrófica, os cupons de prova foram submersos em 1800mL de leite adicionado de 9mL de TSB contendo 10^6 UFC/mL de *Pseudomonas* spp. O conjunto permaneceu sob agitação a 25°C por 18 horas. Para a cepa mesófila, os cupons de prova foram submersos em 1800mL de leite adicionado de 9mL de TSI contendo 10^6 UFC de *Pseudomonas* spp/mL. O conjunto permaneceu sob agitação a 35°C por 18 horas. A cepa psicrotrófica obteve adesão média de $4,4 \times 10^5$ UFC/cm² e a cepa mesófila obteve adesão média de $4,3 \times 10^3$ UFC/cm².

Uma adesão superior à encontrada no presente trabalho foi verificada por Marques (2005) com *S. aureus* em aço inoxidável tipo 304. Para adesão das células bacterianas, cupons foram imersos em placas de Petri contendo BHI e a cultura bacteriana. A cada 48 horas de incubação a 37°C, os cupons eram lavados com PBS para remoção das células não aderidas e novamente embebidos em caldo BHI. Após 15 dias de incubação, a adesão média obtida em aço inoxidável foi de 10^7 a 10^8 UFC/cm². Isto indica que se as condições são propícias para o crescimento e aglomeração, o biofilme pode desenvolver uma estrutura organizada. Portanto, os biofilmes formados nas plantas de processamento se tornam cada vez mais difíceis de remover com o

passar do tempo. Este processo, de acordo com Chmielewski e Frank (2003), é conhecido como maturação.

4.1.2 Avaliação da adesão nos cupons de aço inoxidável após a higienização

As Tabelas 3 e 4 apresentam as contagens de células vegetativas aderidas aos cupons de aço inoxidável, após procedimento CIP nas quatro repetições realizadas:

Tabela 3 – Contagens de células vegetativas de *B. cereus* nos cupons amostrados após a limpeza nas quatro repetições realizadas

R ^a	Contagens (UFC/cm ²)/cupom						Média (UFC/cm ²)	Desvio padrão
	1	2	3	4	5	6		
1	< 10	15	<10	3	<10	<10	3,0	6,0
2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	0,0	0,0
3	< 10	1	1	< 10	5	< 10	1,1	1,9
4	< 10	< 10	3	< 10	4	1	1,3	1,7

^a Repetições

Tabela 4 – Contagens de células vegetativas de *B. cereus* nos cupons amostrados após a limpeza e sanificação nas quatro repetições realizadas

R ^a	Contagens (UFC/cm ²)/cupom						Média (UFC/cm ²)	Desvio padrão
	1	2	3	4	5	6		
1	2	2	<10	<10	<10	14	3,0	5,4
2	< 10	< 10	5	1	< 10	< 10	1,0	2,0
3	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	0,0	0,0
4	< 10	< 10	6	< 10	1	1	1,3	2,3

^a Repetições

Nas quatro repetições realizadas, a etapa de limpeza reduziu a contagem a poucas células remanescentes. Após a sanificação, os resultados permaneceram inalterados.

Ribeiro-Furtini (2005) encontrou resultados similares ao avaliar três tipos de limpeza sobre a aderência de células de *Pseudomonas* spp: alcalina (hidróxido de sódio), alcalina e ácida (hidróxido de sódio e ácido nítrico) e enzimática. Todos os tratamentos foram eficientes na

remoção de células da cepa mesófila e psicrotrófica de *Pseudomonas* spp, reduzindo a < 10 UFC/cm² a contagem. No estudo de Gândara e Oliveira (2000), os cupons com células de *S. thermophilus* foram submetidos à passagem por detergente alcalino, detergente ácido e sanificante à base de hipoclorito de sódio. A limpeza e sanificação mostraram-se eficientes na redução para níveis não detectados da carga de *S. thermophilus* selvagem aderidos na superfície de aço inoxidável.

Marques (2005) observou uma menor redução do número inicial de células aderidas ao avaliar três tipos de sanificantes em aço inoxidável com *S. aureus*. Após tratamento com peróxido de hidrogênio, dicloro isocianurato de sódio e ácido peracético, as contagens médias obtidas foram de aproximadamente 10^3 , 10^4 e 10^3 UFC/cm², respectivamente. Os resultados demonstram a importância de todas as etapas envolvidas na higienização. A realização da limpeza, com utilização de detergentes alcalinos e ácidos remove a matéria orgânica das superfícies, facilitando a ação dos sanificantes nas células aderidas.

No processo de higienização realizado neste experimento, foram seguidas as etapas de limpeza e sanificação fundamentais para remoção de biofilmes. No entanto, mesmo após a sanificação, restaram algumas células na superfície dos cupons. Isto pode ser explicado pela maior resistência dos microrganismos em biofilmes aos sanificantes, por fatores como difusão limitada ou neutralização dos biocidas pela matriz polimérica, baixa taxa de crescimento e aquisição de novas particularidades genéticas, como genes que conferem resistência, resultando de fenótipos resistentes a químicos nos biofilmes (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003).

É importante ressaltar que o processamento moderno de alimentos propicia a formação de biofilmes, devido à produção em massa, ciclos de produção prolongados e vastas superfícies de contato (LINDSAY; VON HOLY, 2006). No presente experimento, após a higienização, restou em uma superfície de 10cm² (área amostrada/cupom) um número de 10 a 30 células. Se esta superfície fizesse parte de um equipamento industrial, em 100cm², seriam encontradas de 100 a 300 células. Portanto, na limpeza de equipamentos industriais, mesmo uma grande redução na população de células aderidas pode ser insuficiente para uma produção segura, pois as células remanescentes podem agir como um filme de condicionamento e propiciar a adesão de outras células. Estas podem acumular em válvulas, fissuras, quinas, formando biofilmes bem estabelecidos. Portanto, os sistemas CIP utilizados nas indústrias devem ser elaborados considerando a remoção de bactérias em biofilmes.

4.2 Avaliação da resistência de esporos de *B. cereus* em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios

4.2.1 Avaliação da adesão de esporos nos cupons de aço inoxidável

A Tabela 5 mostra a contagem de esporos/mL das suspensões preparadas para uso em testes com biofilmes de esporos:

Tabela 5 - Contagem de esporos/mL das suspensões preparadas para uso em testes com biofilmes de esporos a partir de culturas incubadas em garrafas de Roux a 30°C por 6 dias

Tubo	Contagem (esporos/mL)
1	$4,5 \times 10^8$
2	$1,5 \times 10^9$
3	$4,5 \times 10^7$
4	$2,2 \times 10^7$
6	$1,1 \times 10^9$

Para a realização das três repetições previstas no projeto foram utilizadas as suspensões dos tubos 1, 2 e 6. A Tabela 6 apresenta as contagens de esporos aderidos aos cupons de aço inoxidável nas três repetições realizadas:

Tabela 6 – Contagens de esporos de *B. cereus* nos cupons controle nas três repetições realizadas

R^a	Contagens (UFC/cm²)/cupom						Média (UFC/cm²)	Desvio padrão
	1	2	3	4	5	6		
1	$3,3 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$	$6,3 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	184,2
2	$6,5 \times 10^3$	$7,4 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	26483,2
3	$1,7 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$	8861,2

^a Repetições

Nas três repetições realizadas, os esporos de *B. cereus* apresentaram adesão média de $3,7 \times 10^2$, $2,5 \times 10^4$ e $1,8 \times 10^4$ UFC/cm², respectivamente, após tempo de contato de 10 horas com a

superfície de aço inoxidável (tipo 304) com filme de condicionamento e 24 horas de incubação dos cupons a 30°C. Faille et al., (2002), observaram uma adesão ainda maior em sua pesquisa, que avaliou a adesão de esporos de *B. cereus* isolados de linha de processamento de laticínios em cupons de aço inoxidável tipo 304 (45 x 15mm). Os cupons foram imersos em suspensão de esporos em solução salina (10^5 UFC/mL) por 2 horas e a adesão média dos esporos foi 2.6×10^6 UFC/cupom ($1,9 \times 10^5$ UFC/cm²).

De acordo com Peng, Tsai e Chou (2002), os esporos de *B. cereus* possuem uma pronunciada habilidade de aderir a superfícies de aço inoxidável. Faille, Fontaine e Bénézech (2001) compararam a aderência de esporos de seis cepas de *Bacillus* isoladas de linha de processamento de laticínios (três cepas de *B. cereus* e cepas de *B. pumilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis*) em cupons de aço inoxidável tipo 304 (45 x 15 mm). Os cupons foram imersos em suspensão de esporos (10^7 UFC/mL) em creme à base de leite e em solução salina, por 1,5 horas. Independente do tipo de suspensão, os esporos de *B. cereus* demonstraram maior aderência ao aço inoxidável do que as outras espécies. Em suspensão salina a adesão média dos esporos das cepas *B. cereus* foi de 10^6 UFC/cupom ($7,4 \times 10^4$ UFC/cm²) contra adesão média de 10^4 UFC/cupom ($7,4 \times 10^2$ UFC/cm²) das outras espécies. Na suspensão em creme a base de leite a adesão média dos esporos das cepas *B. cereus* foi de 2×10^4 UFC/cupom ($1,4 \times 10^3$ UFC/cm²) contra adesão média de 2×10^3 UFC/cupom ($1,4 \times 10^2$ UFC/cm²) das outras espécies.

4.2.2 Avaliação da adesão de esporos nos cupons de aço inoxidável após a higienização

As Tabelas 7 e 8 apresentam as contagens de esporos aderidos aos cupons de aço inoxidável, após procedimento CIP nas três repetições realizadas:

Tabela 7 – Contagens de esporos de *B. cereus* nos cupons amostrados após a limpeza nas três repetições realizadas

R ^a	Contagens (UFC/cm ²)/cupom						Média (UFC/cm ²)	Desvio padrão
	1	2	3	4	5	6		
1	< 10	<10	<10	<10	1	3	0,6	1,2
2	$3,2 \times 10^2$	$6,4 \times 10^1$	$5,9 \times 10^2$	$5,8 \times 10^1$	NC ^b	NC ^b	$2,5 \times 10^2$	252,7
3	$1,8 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	$2,6 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$	NC ^b	$1,9 \times 10^1$	5,7

^a Repetições

^b Cupom não considerado

Tabela 8 – Contagens de esporos de *B. cereus* nos cupons amostrados após a limpeza e sanificação nas três repetições realizadas

R ^a	Contagens (UFC/cm ²)/cupom						Média (UFC/cm ²)	Desvio padrão
	1	2	3	4	5	6		
1	<10	3	9	2,7 x 10 ¹	<10	<10	6,5	10,6
2	5,7 x 10 ¹	4,3 x 10 ¹	2,5 x 10 ¹	4,9 x 10 ¹	4,4 x 10 ¹	1,1 x 10 ²	5,4 x 10 ¹	29,0
3	4,3 x 10 ¹	3,7 x 10 ¹	2,9 x 10 ¹	3,1 x 10 ¹	6,2 x 10 ¹	NC ^b	4,0 x 10 ¹	13,2

^a Repetições

^b Cupom não considerado

No presente estudo, a adesão média das células vegetativas nos cupons controle foi superior a dos esporos, $1,4 \times 10^5$ UFC/cm² e $1,4 \times 10^4$ UFC/cm², respectivamente. No entanto, após a limpeza, a adesão média das células vegetativas foi reduzida a praticamente zero, enquanto a dos esporos foi de $8,9 \times 10^1$ UFC/cm². Mesmo após a sanificação, a adesão média de esporos remanescentes nos cupons foi de $3,3 \times 10^1$ UFC/cm². Tendo em vista este resultado, foi observado que esporos de *B. cereus* são mais difíceis de remover de superfícies de aço inoxidáveis do que células vegetativas, com programas de CIP.

Os esporos produzidos por *B. cereus* são altamente hidrofóbicos, resultando em uma profunda habilidade, comparada às células vegetativas de aderir a superfícies inertes (PARKAR et al., 2001; Peng, Tsai e Chou, 2002). Faille et al., (2002) e Faille, Fontaine e Bénézech (2001) avaliaram a aderência de esporos de *B. cereus* após a passagem dos cupons de prova por processo CIP: pré-enxágue com água por 5 minutos, passagem por detergente alcalino por 10 minutos a 50°C e novo enxágue com água por 5 minutos. Após o procedimento, a contagem média de esporos residuais foi de 2×10^4 e $2,5 \times 10^5$ UFC/cm² respectivamente. De acordo com Svensson et al., (2006), os esporos de *B. cereus* são muito hidrofóbicos e prontamente aderem a superfícies de aço inoxidável e alguns programas curtos de CIP não conseguem remover todos os esporos das superfícies. Os resultados indicam que programas CIP utilizados em indústrias de laticínios, devem ser elaborados considerando a presença de microrganismos esporulados na planta de processamento e a presença de esporos em biofilmes.

4.3 Exposição das células vegetativas de *B. cereus* a doses subletais do sanificante para avaliação da aquisição de resistência

4.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Tabela 9 apresenta o resultado do teste para determinação da CIM. Foram testadas as soluções de sanificante na faixa de concentração recomendada pelo fabricante (0,1 a 3%) em testes CIM, com doze tubos cada.

Tabela 9 – Resultado do teste das soluções de sanificante preparadas na faixa de concentração recomendada pelo fabricante em séries de doze tubos

Concentração da solução de sanificante (%)	Tubos em cada série do método de diluição em caldo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 ^a	12 ^b
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
0,9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
0,8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
0,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
0,6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
0,4	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
0,3	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
0,2	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
0,1	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+

Nota: Sinais convencionais utilizados:

– Tubo sem crescimento visível

+ Tubo com crescimento visível

^a Controle negativo (TSB + sanificante)

^b Controle positivo (TSB + inóculo)

Como pode ser observado na Tabela 9, na menor concentração recomendada pelo fabricante (0,1%), houve crescimento nos tubos 8, 9 e 10 e CIM no tubo 7. Foi realizado um segundo teste para confirmação deste resultado. Foram selecionadas as menores concentrações (0,1 e 0,2%) para realização do segundo teste. Além dessas, uma concentração ainda menor foi testada para ampliar o espectro da análise de aquisição de resistência, no caso uma diluição abaixo da prevista pelo fabricante (0,05%). A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos:

Tabela 10 – Resultado do teste das soluções de sanificante selecionadas e da solução adicional em séries de doze tubos

Concentração da solução de sanificante (%)	Tubos em cada série do método de diluição em caldo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 ^a	12 ^b
0,2	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
0,1	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
0,05	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+

Nota: Sinais convencionais utilizados:

– Tubo sem crescimento visível

+ Tubo com crescimento visível

^a Controle negativo (TSB + sanificante)

^b Controle positivo (TSB + inóculo)

Como pode ser observado na Tabela 10, no segundo teste a concentração de 0,1% manteve os mesmos resultados do teste anterior (Tabela 9), com a CIM no tubo 7, já na concentração de 0,05% o CIM ocorreu no tubo 6.

Por estar incluída na faixa de concentração recomendada pelo fabricante, foi selecionada a concentração de sanificante de 0,1% para determinação da CIM. Portanto, como pode ser visto na Tabela 10, a CIM do QUATERCAP DM-50 sobre *B. cereus* correspondeu ao 7º tubo da série (Tabela 10).

O sanificante QUATERCAP DM-50 tem em sua composição 50% do composto ativo cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio e sua densidade é 0,955g/mL. Deste modo, com a utilização da solução de concentração 0,1%, a CIM do cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio sobre as células vegetativas de *B. cereus* é 7,4µg/mL, correspondente ao 7º tubo da série.

Neste experimento, foi observado que o produto utilizado apresenta uma margem de segurança grande para inibição do crescimento de células de *B. cereus*, pois a menor concentração recomendada pelo fabricante, a solução de 0,1% , contendo 477µg/mL de composto ativo, precisou ser diluída 31 vezes para alcançar a CIM . A margem de segurança é grande, pois de acordo com Chapman (2003), os sanificantes são geralmente utilizados em concentrações muito mais altas do que suas concentrações inibitórias mínimas com o propósito de alcançar uma rápida velocidade de destruição. Nestas concentrações, que podem equivaler a 1000 vezes a sua CIM, seria impossível para a bactéria superar os ataques massivos e desenvolver resistência. No entanto, na prática é possível que haja situações nas quais a bactéria poderá resistir a uma dose superior à letal.

Isto pode ser visto na primeira parte do experimento, quando foi avaliada a resistência das células vegetativas de *B. cereus* em biofilmes ao processo simulado de higienização por CIP utilizado em laticínios. No procedimento CIP utilizado, as células vegetativas em biofilmes foram submetidas a uma concentração de sanificante (1,2%), muito mais elevada do que o 0,1% utilizada para determinar a CIM. No entanto, na sanificação dos cupons de aço inoxidável, houve sobreviventes (Tabela 4), em uma concentração do QUATERCAP DM-50 muito superior. Isso pode ser atribuído ao fato de que nesse ensaio as células estavam aderidas e formando biofilmes, ao passo que no teste CIM, as células estão livres (PENG; TSAI; CHOU, 2002). Portanto em situações reais, a dose letal de um sanificante pode ser subletal aos microrganismos, em função da formação de biofilmes, ainda que pelo teste CIM a dose devesse ser letal.

4.3.2 Aquisição de resistência ao sanificante pelo crescimento bacteriano em concentrações subletais

Determinada que a CIM do composto na concentração recomendada (0,1%) pelo fabricante foi de 7,4µg/mL, correspondente ao 7º tubo do teste, foi essa concentração e tubo utilizados como parâmetros nos testes para verificar a aquisição de resistência.

As concentrações usadas para a adaptação foram as subletais, que correspondem aos tubos 8, 9 e 10 da série, que não foram inibitórias. As concentrações de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio presentes nestes tubos são: 3,7µg/mL (tubo 8); 1,8µg/mL (tubo 9) e 0,9µg/mL (tubo 10), de acordo com a Figura 10:

Figura 10 – Resultado do teste com aplicação da solução de sanificante de concentração 0,1% para determinação da CIM

Assim, a cepa de *B. cereus* foi cultivada nas três concentrações subletais obtidas: 3,7µg/mL (tubo 8); 1,8µg/mL (tubo 9) e 0,9µg/mL (tubo 10) durante 28 dias. O desafio da cepa a ser testada seria a capacidade de crescer no tubo 7, no qual inicialmente houve inibição.

4.3.2.1 Avaliação da aquisição de resistência da cepa exposta a concentração de 3,7µg do composto ativo /mL (tubo 8) durante 28 dias.

Tabela 11 - Aferição semanal da CIM do *B. cereus* cultivado em TSB + 3,7µg de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio/mL por até 28 dias. Inóculo prévio ao teste obtido em TSA + sanificante

(continua)

Repetição	Dias de exposição	Tubos em cada série											
		1	2	3	4	5	6	7 ^c	8	9	10	11 ^a	12 ^b
1	7	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	14	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	21	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	28	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
2	7	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	14	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	21	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	28	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+

Tabela 11 - Aferição semanal da CIM do *B. cereus* cultivado em TSB + 3,7µg de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio/mL por até 28 dias. Inóculo prévio ao teste obtido em TSA + sanificante

(continuação)

Repetição	Dias de exposição	Tubos em cada série											
		1	2	3	4	5	6	7 ^c	8	9	10	11 ^a	12 ^b
3	7	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
	14	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
	21	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
	28	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+

Nota: Sinais convencionais utilizados:

- Tubo sem crescimento visível

+ Tubo com crescimento visível

^a Controle negativo (TSB + sanificante)

^b Controle positivo (TSB + inóculo)

^c CIM original

Nesse ensaio, como se observa na Tabela 11, não houve aquisição de resistência, pois a concentração do tubo de número 7 (CIM original) continuou inibindo o crescimento da cepa.

Na possibilidade da injúria estar impedindo seu crescimento na concentração letal (tubo 7), a partir de 21 dias de exposição à concentração subletal (3,7µg/mL) a aferição da CIM também passou a ser feita paralelamente com cultivo prévio do *B. cereus* em TSA sem sanificante (Tabela 12). Essa etapa, necessária para a preparação do inóculo para o teste CIM, foi realizada no ensaio anterior (Tabela 11) com cultivo da cepa em TSA com sanificante. Assim, a passagem por TSA sem sanificante serviu de oportunidade para recuperação do metabolismo microbiano. Desse modo, os ensaios foram feitos em duplicata, um com o inóculo originado de TSA + sanificante e outro com um originado de cultivo apenas no TSA.

Tabela 12 – Aferição semanal da CIM do *B. cereus* cultivado em TSB + 3,7µg de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio/mL por até 28 dias. Inóculo prévio ao teste obtido em TSA sem sanificante

Repetição	Dias de exposição	Tubos em cada série											
		1	2	3	4	5	6	7 ^c	8	9	10	11 ^a	12 ^b
1	21	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
2	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
3	28	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+

Nota: Sinais convencionais utilizados:

– Tubo sem crescimento visível

+ Tubo com crescimento visível

^a Controle negativo (TSB + sanificante)

^b Controle positivo (TSB + inóculo)

^c CIM original

Nesse caso, em uma única repetição, houve a revelação da aquisição de resistência, pois ocorreu crescimento do *B. cereus* no tubo de número 7, como pode ser observado na Tabela 12, sendo que anteriormente isso não ocorria (Tabelas 10 e 11). Uma hipótese é que a passagem por um meio capaz de recuperar a injúria do sanificante, tornou a bactéria capaz de suportar e se multiplicar em uma concentração que anteriormente era letal (KURBANOGU; ALGUR, 2006). Ainda assim isso ocorreu somente em uma das três repetições realizadas.

Quando cultivadas em 3,7µg/mL, as células de *B. cereus* não manifestaram aquisição de resistência sem recuperarem a injúria. Em uma situação real, em laticínio, por exemplo, há dois fatores importantes a considerar: em primeiro a possibilidade de formação de biofilmes o que aumenta a resistência aos sanificantes; em segundo a exposição das células de *B. cereus* ao leite, o qual pelo seu alto valor nutritivo, pode ser um elemento de recuperação de injúria.

4.3.2.2 Avaliação da aquisição de resistência da cepa exposta a concentração de 1,8µg do composto ativo /mL (tubo 9) durante 28 dias.

Tabela 13 – Aferição semanal da CIM do *B. cereus* cultivado em TSB + 1,8µg de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio/mL por até 28 dias. Inóculo prévio ao teste obtido em TSA + sanificante

Repetição	Dias de exposição	Tubos em cada série											
		1	2	3	4	5	6	7 ^c	8	9	10	11 ^a	12 ^b
1	7	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	14	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
	21	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
2	7	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
	14	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
3	7	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	14	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+

Nota: Sinais convencionais utilizados:

– Tubo sem crescimento visível

+ Tubo com crescimento visível

^a Controle negativo (TSB + sanificante)

^b Controle positivo (TSB + inóculo)

^c CIM original

De acordo com a Tabela 13, é possível verificar que quando o *B. cereus* foi cultivado em uma concentração mais branda (1,8µg/mL), exibiu então uma maior aquisição de resistência do que nos testes anteriores (Tabelas 11 e 12), nos quais somente foi capaz de demonstrar adaptação após passagem em meio sem sanificante (Tabela 12), o que não ocorreu neste teste. Contudo, não houve avanço em relação a CIM, pois a resistência que foi exibida nesse ensaio continuou sendo pelo crescimento no tubo 7.

Tabela 14 – Aferição semanal da CIM do *B. cereus* cultivado em TSB + 1,8µg de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio/mL por até 28 dias. Inóculo prévio ao teste obtido em TSA sem sanificante

Repetição	Dias de exposição	Tubos em cada série											
		1	2	3	4	5	6	7 ^c	8	9	10	11 ^a	12 ^b
1	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	–	+
2	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
3	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+

Nota: Sinais convencionais utilizados:

– Tubo sem crescimento visível

+ Tubo com crescimento visível

^a Controle negativo (TSB + sanificante)

^b Controle positivo (TSB + inóculo)

^c CIM original

De acordo com a Tabela 14 é possível verificar um progresso na aquisição de resistência. Nos outros ensaios, a aquisição de resistência era demonstrada pela capacidade de crescimento no tubo de número 7 da série (CIM inicial), mas aqui o crescimento ocorreu também no tubo de número 6, de maior concentração. A CIM da cepa de *B. cereus* nesse ensaio passou do tubo 7 para o 5. Esse dado corrobora que a prévia passagem em um meio sem o sanificante, poderia recuperar a injúria e permitir que o microrganismo exiba maior resistência. Isso também ocorreu no teste com exposição à concentração de 3,7µg/mL (Tabela 12), mas nesse caso, a CIM foi a do tubo 7.

4.3.2.3 Avaliação da aquisição de resistência da cepa exposta a concentração de 0,9µg do composto ativo /mL (tubo 10) durante 28 dias.

Tabela 15 – Aferição semanal da CIM do *B. cereus* cultivado em TSB + 0,9µg de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio/mL por até 28 dias. Inóculo prévio ao teste obtido em TSA + sanificante

Repetição	Dias de exposição	Tubos em cada série											
		1	2	3	4	5	6	7 ^c	8	9	10	11 ^a	12 ^b
1	7	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	14	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	21	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	28	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
2	7	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	14	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	21	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	28	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
3	7	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+
	14	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	21	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
	28	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+

Nota: Sinais convencionais utilizados:

– Tubo sem crescimento visível

+ Tubo com crescimento visível

^a Controle negativo (TSB + sanificante)

^b Controle positivo (TSB + inóculo)

^c CIM original

De acordo com a Tabela 15 é possível verificar que não houve aquisição de resistência, sendo a CIM igual a original, ou seja, no tubo de número 7.

Tabela 16 – Aferição semanal da CIM do *B. cereus* cultivado em TSB + 0,9µg de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio/mL por até 28 dias. Inóculo prévio ao teste obtido em TSA sem sanificante

Repetição	Dias de exposição	Tubos em cada série											
		1	2	3	4	5	6	7 ^c	8	9	10	11 ^a	12 ^b
1	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
2	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
3	21	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
	28	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+

Nota: Sinais convencionais utilizados:

– Tubo sem crescimento visível

+ Tubo com crescimento visível

^a Controle negativo (TSB + sanificante)

^b Controle positivo (TSB + inóculo)

^c CIM original

De acordo com a Tabela 16 é possível verificar aquisição de resistência nas três repetições, pois houve crescimento no tubo de número 7 (CIM original). Embora a CIM tenha passado do tubo 7 para o tubo 6, não exibindo uma resistência como no ensaio com a adaptação na concentração de 1,8 µg/mL quando a CIM ocorreu no tubo 5 (Tabela 14), nesse ensaio os resultados foram mais consistentes. Em todas as repetições, a cepa exibiu aquisição de resistência após a exposição durante 28 dias a 0,9µg de cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio/mL, enquanto em todos os testes anteriores, a resistência não foi exibida em todas as repetições.

Figura 11 – Crescimento bacteriano visível no tubo de número 7, indicando aquisição de resistência

No presente trabalho, a cepa de *B. cereus* exibiu aquisição variável de resistência ao sanificante verificada pelo crescimento em concentrações inicialmente letais, ou seja, aumento da CIM do cloreto de alquil amidopropil dimetil benzil amônio nas células de *B. cereus*.

Após exposição a maior concentração subletal utilizada ($3,7\mu\text{g/mL}$) a cepa exibiu aquisição de resistência, apenas em uma repetição e somente no inóculo obtido em TSA sem sanificante, com a CIM aumentando de $7,4\mu\text{g/mL}$ para $14,9\mu\text{g/mL}$.

Já em uma concentração subletal intermediária ($1,8\mu\text{g/mL}$), houve progresso e a cepa exibiu aquisição de resistência tanto a partir do cultivo em TSA sem sanificante quanto no com sanificante, contudo não em todas as repetições do ensaio. Também houve progresso no aumento da CIM, a qual passou de $7,4\mu\text{g/mL}$ para $29,8\mu\text{g/mL}$ (Tabela 14) no ensaio com *B. cereus* cultivado em TSA sem sanificante. Para inóculo obtido a partir do TSA com sanificante o aumento da CIM foi menor, ficando em $14,9\mu\text{g/mL}$.

Finalmente, quando o *B. cereus* foi exposto por 28 dias à concentração subletal de $0,9\mu\text{g/mL}$, ainda mais distante da CIM original ($7,4\mu\text{g/mL}$), a cepa então exibiu aquisição de resistência nas três repetições, mas apenas no cultivo do inóculo em TSA sem sanificante. O aumento da CIM foi de $7,4\mu\text{g/mL}$ para $14,9\mu\text{g/mL}$, sendo nesse ensaio o resultado mais consistente do que nos anteriores.

Com exceção de apenas um ensaio (Tabela 13), a cepa de *B. cereus* demonstrou aquisição de resistência somente nos testes onde o inóculo foi obtido em TSA sem sanificante, com incubação a 30°C por 24 horas. Isto indica que o meio sem sanificante pode ter recuperado a injúria das bactérias expostas, que se tornaram aptas a desenvolver crescimento visível em concentrações mais altas quando submetidas novamente ao teste CIM. Além disso, o resultado demonstra que a exposição a doses subletais resultou em respostas adaptativas estáveis, não revertidas após cultivo em meio sem sanificante.

Resultados similares foram obtidos por TO et al., (2002), que gradualmente aumentou a resistência de cepas de *L. monocytogenes* ao cloreto de benzalcônico (CB) pela inoculação da cultura em tubo de TSB contendo concentração subletal do sanificante. As cepas demonstraram adaptação após uma semana, sendo que o valor de CIM para linhagens inicialmente resistentes aumentou de 4 para 8 µg/mL, enquanto os valores de CIM para linhagens inicialmente sensíveis aumentou de 1 para 5 µg/mL. A resistência adquirida das cepas originalmente sensíveis permaneceu estável após crescimento em meio sem sanificante por 10 meses (TO et al., 2002). Aase et al., (2000), obtiveram respostas adaptativas estáveis pela inoculação de cepas de *L. monocytogenes* em meio TSB contendo concentrações crescentes de CB. Após o período de adaptação, o valor de CIM para linhagens inicialmente resistentes permaneceu inalterado, enquanto os valores de CIM para linhagens inicialmente sensíveis aumentou de 1 para 5 µg/mL. A resistência adquirida permaneceu estável após uma semana de crescimento em TSB puro.

Em contrapartida, Langsrud e Sundheim (1997) observaram a rápida reversão da resistência adquirida de cepas de *Pseudomonas spp* em seu estudo. Neste, foi feita a inoculação de cepas de *Pseudomonas spp* em meio TSB puro, e em meio TSB contendo 200µg/mL de CB (TSB/CB), concentração utilizada na sanificação das plantas de onde foi isolada a bactéria. Além disso, uma cultura incubada por 24 horas em TSB/CB foi inoculada em meio TSB puro (TSB/CB/TSB). Após a incubação as culturas foram expostas a uma concentração de sanificante de 200µg/mL e foi observado que a cultura em TSB puro apresentou redução da população inicial em 3,5 ciclos Log. A cultura em TSB/CB/TSB apresentou redução da população inicial em 4 ciclos Log. contra redução de menos de um ciclo Log. da cultura em TSB/CB.

Segundo Langsrud e Sundheim (1997) a incubação por 24 horas de *Pseudomonas spp* em meio TSB contendo 200µg/mL de CB foi suficiente para obter uma tolerância significativa ao sanificante, porém esta tolerância adquirida foi rapidamente revertida, com

crescimento na ausência de CB. Isto porque a incubação por 24 horas em meio contendo CB pode não ser suficiente para todas as células se tornarem adaptadas, pois os mecanismos de proteção contra um estresse imediato diferem de mudanças causadas por uma longa exposição a ambientes hostis. De acordo com Moorman et al., (2005), é importante distinguir entre resposta ao estresse, que é reversível e adaptação, que resulta em uma resistência estável e maior.

Alguns autores propõem que respostas adaptativas se desenvolvem quando bactérias são expostas a doses subletais de sanificantes (AASE et al., 2000; GANDHI et al., 1993). Em revisão elaborada por Langsrud et al., (2003), diversos relatos indicam que a exposição de bactérias a concentrações subletais de sanificantes resulta em resistência alta e estável.

Em laboratórios, a adaptação é estudada pela exposição de microrganismos a concentrações gradualmente mais altas de sanificantes, porém na prática, a adaptação pode ocorrer em nichos onde há concentrações subletais nas superfícies (LANGSRUD; SUNDHEIM, 1998). Nessa situação diversos fatores, como falha na dosagem de sanificante, limpeza inadequada antes da sanificação, enxágüe inadequado após a sanificação e presença de biofilmes, podem diminuir a eficácia de sanificantes. Nestas condições, onde as bactérias são regularmente expostas a concentrações subletais de sanificantes pode ocorrer uma pressão seletiva para aquisição de genes resistentes ou adaptação de bactérias inicialmente susceptíveis (LANGSRUD; SUNDHEIM, 1998).

Diversos trabalhos têm demonstrado a presença de bactérias resistentes a sanificantes em linhas de processamento de alimentos. Heir, Sundheim e Holck (1995), demonstraram que 13% das cepas de *Staphylococcus* isoladas de uma indústria de processamento de frango eram resistentes ao cloreto de benzalcônio (CB), um composto quaternário de amônio. Langsrud e Sundheim (1997) isolaram cepas de *Pseudomonas spp* de carcaças de frango e constataram que aproximadamente 30% das cepas isoladas possuíam a habilidade de crescer em concentrações normalmente utilizadas do CB (200µg/mL). Em um estudo realizado por Aase et al., (2000), 10% de 200 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em sua maioria, de plantas processadoras de frango e peixe, foram consideradas resistentes ao CB. Lemaitre et al., (1998) isolou *Listeria spp.* de alimentos, humanos e aves selvagens. Aproximadamente 19% das *L. monocytogenes* isoladas de alimentos demonstraram resistência ao CB.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a cepa de *B. cereus* apresentou diferentes respostas frente às três concentrações subletais utilizadas, após 28 dias de exposição. A

recuperação de injúria, pela passagem por meio de cultura sem sanificante foi um fator de influência em todos os ensaios. Em relação à dosagem do sanificante, na concentração subletal mais branda utilizada ($0,9\mu\text{g/mL}$), o resultado foi mais consistente, pois a cepa exibiu aquisição de resistência nas três repetições. O cultivo da cepa na menor concentração subletal apresentou resultados mais coerentes, sugerindo que exposição a doses subletais mais brandas resulta em uma maior resposta adaptativa. Portanto, mais pesquisas devem ser feitas para avaliar o efeito da exposição de bactérias, a doses pequenas de sanificantes, por períodos prolongados, pois é esta a condição que ocorre com as bactérias nas plantas industriais e no interior dos biofilmes e que definitivamente pode gerar cepas com resistência alta e estável.

5 CONCLUSÕES

O procedimento CIP utilizado reduziu significativamente o número de células aderidas nos cupons de aço inoxidável com formação de biofilmes de células vegetativas. As células remanescentes podem ser resultado da maior resistência destas células em biofilmes, já que estes podem atuar como uma barreira física à limpeza e diminuir a ação dos sanificantes.

Os resultados obtidos demonstraram que biofilmes de esporos de *B. cereus* são mais difíceis de remover de superfícies de aço inoxidável do que biofilmes de células vegetativas, com programas de CIP.

A exposição de *B. cereus* a concentrações subletais de composto de quaternário de amônio por períodos prolongados promoveu aquisição de resistência.

REFERÊNCIAS

- AASE, B.; SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S.; RØRVIK, L.M. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 62, n.1-2, p.57-63, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 04 dez. 2007.
- ANDRADE, N.J. de; MACEDO, J.A.B. de. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.
- ANTONIOU, K.; FRANK, J.F. Removal of *Pseudomonas putida* biofilm and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.68, n.2, p. 277-281, 2005.
- ATHAYDE, A. Higienização na indústria de laticínios colabora no controle total da qualidade. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, n.18, 1998, p. 24-29.
- BAHOUT, A.A. Prevalence of *Bacillus* species in UHT milk. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.42, p. 47-53, 2000.
- BREMER, P.J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A.J. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, Oxford, v. 106, n.3, p.254-262, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 8 jun. 2006.
- CÂMARA, S.A.V. **Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, 1998-2001**. 2002. 79p. Monografia – Escola de Saúde Pública “Dr. Jorge David Nasser”, Campo Grande, 2002. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2006
- CHAPMAN, J.S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v.51, n.4, p. 271-273, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 3 ago. 2006.
- CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v.2, n.1, p. 22-32, 2003. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com>>. Acesso em: 23 nov. 2006.
- CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 51, n.4, p. 277-282, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 3 ago. 2006.
- DAVIDSON, P.M.; HARRISON, M.A. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. Scientific Status Summary. **Food Technology**, Chicago, v.56, n. 11, 2002. Disponível em: <<http://members.ift.org>>. Acesso em: 3 ago. 2006.

DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A.K. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**, London, v. 58, n. 1, p.19-24, 2005. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com>>. Acesso em: 16 abr. 2006.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BEÂNEÂZECH, T. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, n.6, p. 892-900, 2001.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BELLON-FONTAINE, M.; SLOMIANNY, C.; BENEZECH, T. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, n.8, p.728-738, 2002.

FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Manual para fabricação de laticínios**. Belo Horizonte: Cetec, 1985.

GÂNDARA, A.L.N.; OLIVEIRA, J.S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n.1, p. 1-7, 2000. Disponível em:<<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 2 ago. 2006.

GILBERT, P.; ALLISON, D.G.; MCBAIN, A.J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, suppl.1, p. 98S-110S, 2002.

HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A.L. Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, n.2, 149–156, 1995.

HORNSTRA, L.M.; LEEUW, P.L.A de; MOEZELAAR, R.; WOLBERT, E.J.; VRIES, Y.P. de; VOS, W.M. de; ABEE, T. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 116, n. 3, p.367–371, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 27 jul. 2007.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Bacillus cereus*. In: _____. **Characteristics of microbial pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. chap. 2, p. 20-35. (Microorganisms in foods, 5).

JANŠTOVÁ, B.; LUKÁŠOVÁ, J.; DRAČKOVÁ, M.; VORLOVÁ, L. Influence of *Bacillus* spp. enzymes on ultra high temperature-treated milk proteins. **Acta Veterinaria Brunensis**, Brno, v. 73, n. 3, p. 393-400, 2004.

KURBANOGU, E.B.; ALGUR, O.F. Utilization of ram horn hydrolysate as a supplement for recovery of heat- and freeze-injured bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 3, p.238-242, 2006.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to quaternary ammonium compound. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, n.6, p. 705-712, 1997.

_____. Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n.6, p. 1006–1012, 1998. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com>>. Acesso em: 12 nov. 2007.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M.S.; HEIR, E.; HOLCK, A.L. Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 51, n.4, p. 283-290, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 3 ago. 2006.

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n.11, p. 2287–2294, 2005.

LEMAITRE, J.P.; ECHCHANNAOUI, H.; MICHAUT, G.; DIVIES, C.; ROUS-SET, A. Plasmid-mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n.11, p. 1459–1464, 1998.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. What food professionals should know about bacteria biofilms. **British Food Journal**, Bradford, v.108, n.1, p. 27-37, 2006. Disponível em: <<http://www.emeraldinsight.com>>. Acesso em: 20 jul. 2006.

LINDSAY, D.; BRÖZEL, V.S.; VON HOLY, A. Spore formation in *Bacillus subtilis* biofilms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.68, n. 4, p. 860-865, 2005.

LINDSAY, D.; BRÖZEL, V.S.; VON HOLY, A. Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 5, p. 1168- 1172, 2006.

LINDSAY, D.; BRÖZEL, V.S.; MOSTERT, J.F.; VON HOLY, A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, n.2, p. 352-361, 2002.

MARQUES, S.C. **Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. 2005.64p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARTINS, A.M.S. **Identificação e verificação da resistência aos sanitizantes dos microrganismos presentes na água destinada ao abastecimento público e em um sistema de purificação.** 2002. 164p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, n.10, p. 2760-2764, 1998.

MOORMAN, M; NETTLETON, W; RYSER, E; LINZ, J; PESTKA, J. Altered sensitivity to a quaternary ammonium sanitizer in stressed *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.68, n.8, p.1659-1663, 2005.

MORAES, M S.V. **Isolamento de esporos aeróbios mesófilos e termófilos em equipamentos de abatedouro de aves e avaliação de suas resistências a sanificantes químicos.** 1996. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico.** 6 th ed. Villanova: NCCLS, 2003.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, n.3, p. 512-520, 2000.

NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; TE GIFFEL, M.; PEETERS WEEM, P. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. **Food Microbiology**, London, v.14, 143–151, 1997.

OKAZAKI, M.M. **Adaptação do método de suspensão para determinação da atividade bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônico em concentrações acima de 200mg/L.** 2003. 85p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PACHECO, A.B.N.D. **Atividade antimicrobiana de desinfetantes comerciais para uso em odontologia.** 2003. 140p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003. Disponível em: < <http://www.unicamp.br> >. Acesso em: 16 ago. 2006.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; BROOKS, J.D. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli: potential consequences for cleaning. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Hampshire, v. 30, n.9, p. 553-560, 2003. Disponível em: <<http://www.springerlink.com>>. Acesso em: 8 ago. 2006.

_____. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, n.1, p. 110-116, 2004.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; PALMER, J.S.; BROOKS, J.D. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, n.6, p. 901-908, 2001.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L. F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.70, n.4, 2003. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br>>. Acesso em: 27 jul. 2006.

PENG, J.S.; TSAI, W.C.; CHOU, C.C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 77, n.1-2, p. 11-18, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 5 jul. 2006.

PENNA, T.C.V.; MAZZOLA, P.G.; MARTINS, A.M.S. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. **BMC Infectious Diseases**, London, v.1, n.16, 2001. Disponível em:<<http://www.biomedcentral.com>>. Acesso em: 2 ago. 2006.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v.32, n.6, p.321-326, 1999.

REZENDE, N.C.M.; ROSSI Jr., O.D.; AMARAL, L.A. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature) **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.7, n. 3, p.162-166, 2000.

RIBEIRO-FURTINI, L.L. **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergentia**. 2005. 80p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 2 th ed. London: Blackwell Scientific, 1992. 639 p.

RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Biofilm Formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.68, n.12, p. 2614–2622, 2005.

RYU, J.H.; KIM, H; BEUCHAT, L.R. Spore formation by *Bacillus cereus* in broth as affected by temperature, nutrient availability, and manganese. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.68, n.8, p. 1734-1738, 2005.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; NADER FILHO, A.; DIMENSTEIN, A.R. Ocorrência de bactérias esporuladas do gênero *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n. 42, p.25- 27, 1996.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F. S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológicas de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007. 552p.

SILVA, R.Z. da; RIOS, E. de M.; SILVA, M.Z. da; LEAL, L. de F.; YUNES, R.A.; MIGUEL, O. G.; CECHINEL FILHO, V. Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana da *mikania lanuginosa* dc (asteraceae). **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.3, n. 2, p. 59-64, 2002. Disponível em: < <http://calvados.c3sl.ufpr.br>>. Acesso em: 9 set. 2007.

SVENSSON, B.; MONTHÁ, A.; SHAHEEN, R.; ANDERSSON, M.A.; SALKINOJA-SALONEN, M.; CHRISTIANSSON, A.; Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. p.740–749, 2006

TO, M. S.; FAVRIN, S.; ROMANOVA, N.; GRIFFITHS, M. W. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of listeria monocytogenes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington , v.68, n.11, p.5258-5264, 2002.

VALERO, M.; SARRIAS, J.A.; ALVAREZ, D.; SALMERÓN, M.C. Modeling the influence of electron beam irradiation on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Food Microbiology**, London, v.23, n.4, p. 367-371, 2006.

VEENING, J.W.; KUIPERS, O.P.; BRUL, S.; HELLINGWERF, K.J.; KORT, R. Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.188, n.8, p. 3099-3109, 2006. Disponível em: < <http://jb.asm.org>>. Acesso em: 8 ago. 2006.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI JR., O.D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.3, p.396-400, 2005.

WIJMAN, J.G.E.; LEEUW, P.P.L.A. de; MOEZELAAR, R.; ZWIETERING, M.H.; ABEE, T. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 151, n. 5, p. 1481–1488, 2007.

WIRTANEN, G.; SALO, S. Biofilm risks. In: _____. **Handbook of hygiene control in the food industry**. Cambrige:Woodhead Publishing Limited, 2005. chap. 3, p.46-72.

XAVIER, J.B.; PICIOREANU, C.; RANI, S.A.; LOOSDRECHT, V.M.C.M.; STEWART, P.S. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study. **Microbiology**, Reading, v.151, n.12, p. 3817-3832, 2005.