UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LAURA CRISTINA DA CRUZ DOMINCIANO

**Avaliação da oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados,
para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria*
monocytogenes e *Escherichia coli* em superfícies inertes**

Pirassununga/SP

2015

LAURA CRISTINA DA CRUZ DOMINCIANO

**Avaliação da oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados,
para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria*
monocytogenes e *Escherichia coli* em superfícies inertes**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga/SP

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

D671a

Dominciano, Laura Cristina da Cruz

Avaliação da oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados, para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em superfícies inertes / Laura Cristina da Cruz Dominciano. -- Pirassununga, 2015.

96f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.

1. Sanitizante 2. Biofilme 3. Oleuropeína 4. *Listeria monocytogenes* 5. *Staphylococcus aureus* 6. *Escherichia coli*. I. Título.

LAURA CRISTINA DA CRUZ DOMINCIANO

**Avaliação da oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados,
para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria*
monocytogenes e *Escherichia coli* em superfícies inertes**
(versão corrigida)

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira
Presidente da Banca Examinadora
Departamento de Engenharia de Alimentos – FZEA/USP

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin
Departamento de Engenharia de Alimentos – FZEA/USP

Profª Drª Elaine Cristina Pereira de Martinis
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Profª Drª Eliana Setsuko Kamimura
Departamento de Engenharia de Alimentos – FZEA/USP

*À minha família e aos meus alunos,
motivação maior de meus estudos*

AGRADECIMENTOS

Ao meu espírito protetor, por me ajudar a progredir.

Ao Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, a minha gratidão por me receber com tanta generosidade em seu laboratório. Obrigada por sua orientação, pelas oportunidades que me ofereceu e por seus ensinamentos.

À USP/Pirassununga, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) pela estrutura oferecida e pela oportunidade de efetivar este estudo.

À UNIP, Universidade Paulista, Instituição que leciono e atuo, pelo apoio e incentivo na realização deste estudo de doutorado.

Ao Cosmo Pacetta, pelos ensinamentos sobre as folhas de Oliveira, em particular sobre um dos seus componentes, fruto deste estudo, a oleuropeína.

Aos professores Dr. João Negrão, Dr. Paulo José do Amaral Sobral e Dr^a Elaine Cristina Pereira de Martinis por cederem seus laboratórios para a realização dos experimentos deste estudo. Ao Prof. Carlos Corassin, pela colaboração na estatística.

Aos técnicos de laboratório Roice Eliana Rosim, Rodrigo Vinícius Lourenço e Sandra A. de Oliveira da FZEA pelas colaborações nas leituras dos experimentos. Às técnicas da USP de Ribeirão Preto, Vanessa Maciel de Souza pela contribuição e Elizabete Rosa Milani pelas leituras na microscopia confocal (FAPESP, processo 2004/08868-0). À estagiária Jéssica Santello que colaborou nos experimentos em laboratório. Às colegas de laboratório, pelas palavras de apoio e meu especial agradecimento à Sarah Hwa In Lee, por seu apoio e disposição em me ajudar e me ensinar a executar os experimentos.

Às minhas colegas de profissão, às coordenadoras e às diretoras Melânia Dalla Torre e Cármen C. T. Maschietto da UNIP/Campus São José do Rio Pardo, pela compreensão e apoio e, a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

À minha família, aos amigos próximos e em especial ao meu companheiro Cássio, pela compreensão das minhas ausências em prol dos resultados desse momento.

Muito obrigada!

Cada peça ou parte da natureza é sempre uma aproximação da verdade completa, ou do que podemos conhecer da verdade completa. De fato, tudo o que sabemos é uma espécie de aproximação, porque sabemos que não conhecemos ainda todas as leis. Portanto, as coisas são aprendidas apenas para serem desaprendidas ou, mais provavelmente corrigidas.

RICHARD FEYNMAN

RESUMO

DOMINCIANO, L.C.C. **Avaliação da oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados, para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em superfícies inertes.** 2015. 97f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Este estudo avaliou a eficiência da oleuropeína (OLE) (composto fenólico extraído das folhas de Oliveira) isolada e associada aos sanitizantes comerciais ácido peracético 2% (APA), hipoclorito de sódio 2% (HS), peróxido de hidrogênio 3% (PH), digluconato de clorexidina 2% (DC), cloreto de benzalcônio 1% (CB) e iodofor 2% (IO), para inativação de células em suspensão e biofilmes monoespécie e multiespécie formados em superfícies de aço inoxidável ou microplaca de poliestireno por *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), todas classificadas como fortes produtores de biofilmes. Os isolados foram semeados em caldo TSB (caldo tripticase soja), incubados (37°C/24h) e corrigidos a $\sim 10^8$ células/mL (escala 0,5 McFarland). Para bactérias em suspensão, a resistência a sanitizantes foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) em tubos e pelo método de Disco Difusão em Ágar (DDA), no qual as bactérias foram plaqueadas em ágar TSA contendo discos de 6mm de papel filtro embebidos nos sanitizantes. Após a incubação, a medição dos halos de inibição foi feita com paquímetro. Para os ensaios de resistência dos biofilmes aos compostos sanitizantes, foram utilizadas microplacas de poliestireno 96 poços, as quais foram preparadas para incubação-fixação dos biofilmes e submetidas à leitura em espectrofotômetro de ELISA (600 nm). Em seguida, as placas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS, pH 7.4) e os sanitizantes inseridos por 1 minuto. Após neutralização com tiosulfato de sódio (5 minutos), as placas foram lavadas com PBS e metanol, coradas com cristal violeta 1% e coradas com ácido acético glacial (33%) para nova leitura a 570nm. A eficácia da remoção do biofilme pelos sanitizantes foi comparada pelo índice de formação de biofilme (IFB). As imagens do aço inoxidável após tratamento com sanitizante foram feitas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal, para visualizar a persistência dos biofilmes. Os valores de CIM (diluição 1:2) mostraram que OLE não teve atividade bactericida. No método DDA, *L. monocytogenes*, foi resistente à OLE, enquanto *E. coli* e *S. aureus* apresentaram resistência intermediária. Os sanitizantes comerciais apresentaram boa atividade bactericida nos ensaios de CIM e DDA, sendo que as associações de OLE aos sanitizantes comerciais aumentaram o efeito germicida. Nos ensaios com biofilmes em monoespécie, somente os sanitizantes comerciais, isolados ou associados com OLE, foram eficazes de reduzir o valor de BFI em microplaca de poliestireno. Em biofilmes multiespécie, OLE apresentou efeito antimicrobiano, sobretudo sobre a associação de *L. monocytogenes* + *E. coli* + *S. aureus* (redução: 91,49%). Nenhum dos compostos avaliados foi capaz de inativar completamente os biofilmes nas superfícies de aço inoxidável, uma vez que células viáveis foram observadas após os tratamentos com os sanitizantes, indicando persistência dos biofilmes. Os resultados indicam que a oleuropeína apresentou potencial para incrementar o efeito bactericida de sanitizantes comerciais para eliminação de biofilmes em superfícies inertes, sendo necessários estudos para compreender os mecanismos de ação dessas combinações.

Palavras-chave: sanitizante; biofilme; oleuropeína; *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*

ABSTRACT

DOMINCIANO, L.C.C. **Evaluation of oleuropein and chemical sanitizers, alone or in combination, to eliminate biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on inert surfaces.** 2015. 97f. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

This study evaluated the efficiency of oleuropein (OLE) (a phenolic compound extracted from Oliveira leaves) alone or in association with commercial sanitizers peracetic acid 2% (PPA), sodium hypochlorite 2% (SH), hydrogen peroxide 3% (HP), chlorhexidine digluconate 2% (CD), benzalkonium chloride 1% (BC) and iodophor 2% (IO), for inactivation of suspended cells and monospecies or multispecies biofilms formed on stainless steel surfaces or microplate polystyrene by *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922), all classified as strong producers of biofilms. The isolates were grown in TSB (trypticase soy broth), incubated (37°C/24 h) and adjusted to $\sim 10^8$ cells/mL (0.5 McFarland scale). For the bacterial suspensions, resistance to sanitizers was determined by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in tubes and by Agar Disk Diffusion (ADD), in which the bacteria were plated on TSA agar containing 6mm disks of filter paper soaked in sanitizers. After incubation, measurement of the inhibition halos was done using a caliper rule. For the sanitizer resistance assays with biofilms, polystyrene 96-well microplates were prepared for incubation-fixing of biofilms and read in an ELISA spectrophotometer (600 nm). After, the plates were washed with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and the sanitizers were placed for 1 minute. After neutralization with sodium thiosulfate (5 minutes), the plates were washed with PBS and methanol, stained with 1% crystal violet and stained with glacial acetic acid (33%) for a new reading at 570 nm. The effectiveness of biofilm removal by each sanitizer was compared using a Biofilm Formation Index (IFB). The images from stainless steel coupons after treatments with sanitizers were obtained by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Confocal Microscopy, to view the persistence of biofilms. MIC values (dilution 1: 2) showed that OLE had no bactericidal activity. In the ADD assays, *L. monocytogenes* was resistant to OLE, while *E. coli* and *S. aureus* showed intermediate resistance. Commercial sanitizers showed good bactericidal activity in both CIM and DDA assays, and the associations of OLE with commercial sanitizers increased their germicidal effect. In the monospecies biofilm assays, only commercial sanitizers, isolated or associated with OLE, were effective for reducing the BFI values in polystyrene microplates. In multispecies biofilms, OLE had an antimicrobial effect, especially on the association of *L. monocytogenes* + *E. coli* and *S. aureus* (reduction: 91.49%). None of the compounds evaluated was able to completely inactivate the biofilms on the stainless steel surfaces, since viable cells of bacteria were observed after treatment with sanitizers, indicating persistence of biofilms. The results indicate that oleuropein has the potential to enhance the bactericidal effect of commercial sanitizers to eliminate biofilms on inert surfaces. Further studies are needed to understand the mechanisms of action of these combinations.

Keywords: sanitizing; biofilm; oleuropein; *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de desenvolvimento da formação de um biofilme, onde em a) ocorre a colonização primária em substrato com nutrientes; b) as células se dividem, formando microcolônias com a formação da matriz exopolimérica (EPS); c) células secundárias aderem às microcolônias; d) formação do biofilme contendo multiespécies maduras	32
Figura 2: Esquemática da persistência do biofilme após a sanitização, onde inicialmente as moléculas orgânicas de alimento são depositadas na superfície do material e formam uma película. Depois os microrganismos biologicamente ativos são atraídos para as moléculas orgânicas e, por último, as células microbianas persistentes permanecerão após a limpeza e sanitização, reiniciando o crescimento e formação do biofilme, com a expressão celular de genes e <i>quorum sensing</i>	37
Figura 3. Estrutura molecular de oleuropeína e seu metabólito hidroxitirosol	43
Figura 4. Fluxograma representando os diferentes métodos utilizados para avaliação da redução de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> como células em suspensão e biofilme (monoespécie e multiespécie) ao ser testados com a oleuropeína isolada ou associada aos sanitizantes comerciais, em suas análises qualitativas e quantitativas	47
Figura 5. Esquema do método de diluição em caldo em série composta por doze tubos, onde do 1º tubo foi retirado 5mL de sanitizante e inserido no 2º tubo e assim sucessivamente até o tubo 11. Os controles eram os tubos 11(C-), contendo BHI com sanitizante e o tubo 12(C+), que continha apenas BHI com o inóculo	51
Figura 6. Exemplo dos procedimentos do experimento realizado na microplaca de 96 poços. Controle negativo com quatro poços e controle positivo representado nas linhas G e H com as triplicatas de cada biofilme em monoespécie e em multiespécie, sem o tratamento com sanitizante. Os tratamentos das triplicatas de biofilmes expostos aos sanitizantes estão representados nas linhas A/B, C/D e E/F.....	55
Figura 7. Ilustração de microplaca de 24 poços de fundo chato com o biofilme formado pelos isolados, visualizados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após coloração pelo corante cristal violeta (1%). Legenda: LM1 = <i>L. monocytogenes</i> ; SA2 = <i>S. aureus</i> ; EC3 = <i>E. coli</i> ; SE4 = <i>S. epidermidis</i> (controle); LM+SA5 = <i>L. monocytogenes</i> + <i>S. aureus</i> ; SA+EC6 = <i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> ; LM+SA+EC7 = <i>L. monocytogenes</i> + <i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> ; LM+EC8 = <i>L. monocytogenes</i> + <i>E. coli</i>	57
Figura 8. Análise da formação e crescimento de biofilmes em cupons de aço inoxidável, observados em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Legenda:	

A = *Escherichia coli*; **B** = *Staphylococcus aureus*; **C** = *Listeria monocytogenes*; **D** = *L. monocytogenes* + *E. coli*; **E** = *L. monocytogenes* + *S. aureus*; **F** = *S. aureus* + *E. coli*; **G** = *L. monocytogenes* + *S. aureus* + *E. coli*; **H** = controle negativo (*S. epidermidis*) 61

Figura 9. Placas de Petri com os halos de inibição pelo método de disco difusão em ágar. **Legenda:** A) *L. monocytogenes* com Oleuropeína; B) *S. aureus* com Oleuropeína; C) *E. coli* com Oleuropeína; D) *E. coli* com Oleuropeína + Ácido Peracético..... 65

Figura 10: Fotomicrografias de Microscópio eletrônico de varredura (TM300-Hitachi, Japão) com biofilmes de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* aderidos ao aço inoxidável após tratamento com os sanitizantes em aumento de 1000 e 5000X e tensão de 15Kv. **Legenda:** A - *E. coli* após tratamento com ácido peracético; B - *E. coli* após tratamento com hipoclorito de sódio; C - *L. monocytogenes* após tratamento com ácido peracético; D - *S. aureus* após tratamento com cloreto de benzalcônio em conjunto com a oleuropeína 73

Figura 11: Fotomicrografias de microscópio confocal com aumento de 630x com óleo de imersão. Biofilmes de *E. coli* ATCC 25.922 formados em superfície de aço inoxidável por 48 horas a 37°C. As células foram tratadas com sanitizante por 1 minuto, neutralizadas e em seguida foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD. Células viáveis foram coradas de verde fluorescente (Syto 9) e células não-viáveis foram coradas de vermelho fluorescente (iodado de propídeo). **Legenda:** A - *E. coli* após tratamento com ácido peracético (APA); B - *E. coli* após tratamento com Oleuropeína (OLE); C - *E. coli* após tratamento com APA+OLE; D - *E. coli* sem tratamento (Controle)..... 74

Figura 12: Fotomicrografias de microscópio confocal e de fluorescência com aumento de 630x com óleo de imersão. Biofilmes de *S. aureus* ATCC 29.213 formados em superfície de aço inoxidável por 48 horas a 37°C. As células foram tratadas com sanitizante por 1 minuto, neutralizadas e em seguida foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD. Células viáveis foram coradas de verde fluorescente (Syto 9) e células não-viáveis foram coradas de vermelho fluorescente (iodado de propídeo). **Legenda:** A - *S. aureus* após tratamento com ácido peracético (APA); B - *S. aureus* após tratamento com Oleuropeína (OLE); C - *S. aureus* após tratamento com APA+OLE; D - *S. aureus* sem tratamento (Controle) 75

Figura 13: Fotomicrografias de microscópio confocal com aumento de 630x com óleo de imersão. Biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 7644 formados em superfície de aço inoxidável por 48 horas a 37°C. As células foram tratadas com sanitizante por 1 minuto, neutralizadas e em seguida foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD. Células viáveis foram coradas de verde fluorescente (Syto 9) e células não-viáveis foram coradas de vermelho fluorescente (iodado de propídeo). **Legenda:** A - *L. monocytogenes* após tratamento com ácido peracético (APA); B - *L. monocytogenes* após tratamento com Oleuropeína (OLE); C - *L. monocytogenes* após tratamento com APA+OLE; D - *L. monocytogenes* sem tratamento (Controle) 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das 3 espécies de bactérias patogênicas, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Escherichia coli</i> , formadoras de biofilmes, segundo GERMANO; GERMANO (2011)	22
Tabela 2. Tipos de sanitizantes químicos mais utilizados na indústria de alimentos com suas vantagens e desvantagens de uso	41
Tabela 3. Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	52
Tabela 4. Capacidade de formação de biofilme por <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> e suas combinações na microplaca de 96 poços.	59
Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sanitizantes avaliados e da oleuropeína para os isolados bacterianos em mg/mL, em série composta por doze tubos pelo método de diluição em caldo (com diluição 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, C- e C+) de acordo com protocolo da NCCLS (2003)	62
Tabela 6. Resultados obtidos de acordo com as normas NCCLS (2003), adaptado de Ostrosky et al. (2008) do halo de inibição em disco difusão em ágar com a média das triplicatas dos sanitizantes como antimicrobianos para células em suspensão para a resistência de <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> . O halo da água milli-Q foi usado como controle negativo.....	66
Tabela 7. Índice de Formação de Biofilme (IFB) em microplaca de poliestireno, das cepas individuais de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> e percentuais de redução após os tratamentos com ácido peracético (APA) e hipoclorito de sódio (HS), isolados ou associados à oleuropeína (OLE).	68
Tabela 8. Índice de Formação de Biofilme (IFB) em microplaca de poliestireno, das cepas combinadas de <i>Escherichia coli</i> (EC), <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) e <i>Listeria monocytogenes</i> (LM), e percentuais de redução após os tratamentos com oleuropeína (OLE), ácido peracético (APA), digluconato de clorexidina (DC), cloreto de benzalcônio (CB), hipoclorito de sódio (HS), isolados ou associados à oleuropeína (OLE)	71

LISTA DE SIGLAS

ANOVA - análise de variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA - ácido peracético
BHI - *Brain Heart Infusion*
CB - cloreto de benzalcônio
CCA - Comissão do *Codex Alimentarius*
CIM - Concentração Inibitória Mínima
DAEC - *E. coli* difusamente aderente
DC - digluconato de clorexidina
DDA - Disco Difusão em Ágar
DO - densidade ótica
DSIH - Sistema de Informações Hospitalares
DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos
EPEC - *Escherichia coli* patogênica clássica
EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
EHEC - *Escherichia coli* enterro-hemorrágica
EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EPS - matriz exopolimérica
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
HS - hipoclorito de sódio
IAE - Intoxicação Alimentar Estafilocócica
IFB - Índice de Formação de Biofilme
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPAAZ - Instituto Pan-Americano de Alimentos e Zoonoses
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
OLE - oleuropeína
OPAS - Instituto Pan-Americano da Saúde
PH - peróxido de hidrogênio
PVC - policloreto de vinila

SHU - Síndrome Hemolítico-Urêmica

SNVE - Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

SUS - Sistema Único de Saúde

IO - Iodofor

TSA - Ágar Triptico de Soja

TSB - caldo tripticase soja

UTI - Unidades de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Bactérias patogênicas de importância em alimentos	19
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	26
2.1.3 <i>Escherichia coli</i>	28
2.2 Biofilmes bacterianos	31
2.3 Procedimentos para higienização de superfícies na indústria de alimentos	35
2.4 Sanitizantes químicos comerciais	38
2.5 Oleuropeína	42
3. OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Isolados bacterianos	48
4.2 Verificação da capacidade de produção de biofilmes em microplaca de poliestireno	48
4.3 Verificação da capacidade de produção de biofilmes em cupom de aço inoxidável	49
4.4 Avaliação comparativa da atividade bactericida da oleuropeína com sanitizantes químicos	50
4.4.1 Perfil de resistência por determinação da Concentração Inibitória Mínima	50
4.4.2 Teste de Resistência através de Disco Difusão em Ágar	52
4.5 Avaliação comparativa da eficiência da oleuropeína na eliminação de biofilmes bacterianos	53
4.5.1 Microplaca de poliestireno	53
4.5.2 Cupom de aço inoxidável	55
4.6 Avaliação qualitativa da eliminação de biofilmes em contato com sanitizantes	56
4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	56
4.6.2 Microscopia Confocal	57
4.7 Análise dos resultados	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.5.1 Verificação da capacidade de formação de biofilmes em microplaca de poliestireno	59
4.5.2 Verificação da capacidade de formação de biofilmes em aço inoxidável	60

5.3 Perfil de resistência à oleuropeína e agentes sanitizantes por determinação da Concentração Inibitória Mínima	62
5.4 Teste do halo de inibição em Disco Difusão em Ágar	65
5.5 Avaliação da oleuropeína e sanitizantes químicos sobre biofilmes em microplaca de poliestireno	68
5.6 Avaliação da oleuropeína e sanitizantes químicos sobre biofilmes em aço inoxidável, através de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	72
5.7 Avaliação da oleuropeína e sanitizantes químicos sobre biofilmes em aço inoxidável, através de Microscopia Confocal.....	73
6. CONCLUSÕES.....	78
7. RECOMENDAÇÕES.....	79
REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

Os estudos de avaliação de plantas como fonte de produtos naturais para conservar a saúde humana aumentam a cada ano e já se sabe que os componentes fenólicos de origem vegetal apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias. Dentre estes componentes, a Oleuropeína, composto fenólico com propriedades antimicrobianas, encontrada em maior quantidade na árvore de Oliveira pode ser uma possível solução como agente sanitizante.

O grande desafio das indústrias de alimentos, no que se refere aos aspectos microbiológicos, é a implantação de sistemas efetivos de agentes de limpeza que removam as sujidades e sanitizantes que tenham eficiência por seus efeitos sobre equipamentos e superfícies a fim de remover esses microrganismos e evitar as contaminações dos alimentos.

Estes alimentos oferecidos aos consumidores não devem causar prejuízos à saúde e, portanto, não devem veicular microrganismos patogênicos, onde se adotam boas práticas na gestão da qualidade em toda a cadeia produtiva e as legislações buscam a padronização e o controle cada vez mais rígido dentro de empresas, com grandes avanços na segurança dos alimentos. Porém a saúde humana ainda pode ser gravemente afetada pela ingestão de perigos físicos, químicos e biológicos, envolvidas em surtos alimentares e contaminações patogênicas, quando grandes quantidades de alimentos são produzidas continuamente porque falhas nos procedimentos de higienização favorecem a aderência de resíduos nas superfícies, tornando-se potenciais multiplicadores de microrganismos. Há um número significativo de relatos sobre a persistência de alguns agentes patogênicos de origem alimentar nas superfícies de contato com alimentos e biofilmes, afetando a qualidade e a segurança dos produtos alimentares.

Áreas de processamento de alimentos são caracterizadas pela presença de biofilme, devido ao acúmulo de materiais orgânicos e inorgânicos em superfícies, sobre as quais as comunidades bacterianas podem se desenvolver. Biofilmes podem se tornar fortemente aderidos à superfície e, posteriormente, parte deles podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios. Microrganismos em biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização, representando

fonte original de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e veiculação de toxinfecções alimentares.

A sanitização finaliza o processo de higienização. Sanitizantes são agentes normalmente químicos que matam formas vegetativas, mas não necessariamente as formas esporuladas de microrganismos patogênicos e um bom sanitizante não pode ser corrosivo aos materiais industriais, não pode ser tóxico e irritante aos manipuladores, devendo ser econômico e de fácil enxágue e ter ação rápida. Sabe-se que não existem sanitizantes que atendam a todos esses quesitos em um único produto, então estudos são imprescindíveis para descobrir novos agentes que atendam a essas necessidades. Com isso, este estudo é uma possível solução, os efeitos antibacterianos da oleuropeína, um éster heterocíclico, composto de tirosol e ácido elenólico, inodoro e atóxico, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas e encontradas em grande quantidade nas folhas e frutos da árvore de Oliveira *Olea europaea* L.

Os biofilmes são de um modo geral, prejudiciais por serem fontes de contaminação e por serem resistentes e/ou persistentes a sanitizantes químicos, dificultando seu combate e causando problemas em vários setores da produção e da saúde. Nesta pesquisa, foram estudadas as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, por serem formadoras de biofilmes e foi feita uma comparação dos sanitizantes químicos mais utilizados na higienização dos locais de produção alimentar, que são o ácido peracético, o cloreto de benzalcônio, o digluconato de clorexidina, o hipoclorito de sódio, o peróxido de hidrogênio e o iodoform para saber qual desses é o mais efetivo na redução desses biofilmes e compará-los com a ação sanitizante das propriedades antimicrobianas da oleuropeína.

Com base nesses aspectos, delineou-se um experimento com a finalidade de se verificar se a oleuropeína é eficiente sozinha ou em conjunto com os sanitizantes químicos mais utilizados nas indústrias de alimentos, que pelas necessidades de melhorar os padrões de higiene, buscam sanitizantes mais potentes a fim de reduzir sua utilização, reduzir custos, contribuir para as condições mais seguras de trabalho e com isso minimizar o manuseio e exposição humana a substâncias perigosas, além de buscar soluções na segurança alimentar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias patogênicas de importância em alimentos

A principal preocupação para os consumidores, indústria de alimentos e órgãos governamentais é com a segurança do alimento, do ponto de vista microbiológico.

A ação dos agentes patogênicos depende da precariedade das condições de higiene do meio e da suscetibilidade do hospedeiro humano e isto tem tido implicações graves para a saúde humana. Estima-se que, anualmente, ocorra 1,5 bilhão de episódios de gastroenterite aguda em todo o mundo, dos quais 70% são causados pela ingestão de alimentos contaminados (BALBANI; BUTUGAN, 2001). O resultado final é trágico, uma vez que as diarreias de natureza infecciosa, principalmente as provocadas por agentes bacterianos, constituem um dos mais importantes problemas de saúde pública de repercussão mundial e continuam a representar a maior causa de óbito entre crianças menores de cinco anos, totalizando uma média anual mundial de 3 milhões de mortes (GUIMARAES et al, 2001).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são causadas por agentes biológicos, químicos ou físicos, que penetram no organismo humano através da ingestão de água ou alimentos contaminados (GERMANO; GERMANO, 2011), sendo este último a maior causa das enfermidades (PINTO, 1996) podendo causar toxinfecção alimentar, caracterizada por um quadro gastroentérico. Com isso, a contaminação microbiológica dos alimentos tem sido objeto de preocupação constante em diversos países. Nos Estados Unidos (EUA), em 1993 foi descrita a ocorrência de 6,5 milhões de casos de toxinfecções alimentares e 9.000 óbitos por ano (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006). A globalização econômica facilitou a distribuição alimentar e com isso, os dados subiram para 33 milhões de casos/ano de toxinfecções alimentares (BALBANI; BUTUGAN, 2001). Num estudo realizado na Inglaterra foram constatados que para cada caso notificado de DTA, existem mais 136 casos não notificados (FORSYTHE, 2000). No Reino Unido, segundo Balbani; Butugan (2001) chegou a ocorrer 35.000 internações hospitalares/ano para tratamento das gastroenterites. No Brasil, os dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, demonstram notificações em cerca de 570 mil casos/ano e uma média de 6.320

óbitos/ano (CARMO et al. 2005), porém é importante ressaltar que essa incidência é subestimada, posto que o perfil epidemiológico das DTAs ainda é pouco conhecido devido à baixa notificação dos surtos. Seus sintomas geralmente são parecidos com gripes ou discretas diarreias e vômitos e, em média apenas 10% dos pacientes adultos com diarreia procuram os serviços médicos e destes, somente 20% são submetidos a exames de coprocultura (WELKER et al, 2010).

Segundo Carmo et al. (2005), o número de surtos notificados está relacionado com o nível de implantação do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SNVE) das DTAs nos municípios. Esse sistema, cujo objetivo geral é reduzir a incidência das DTAs no Brasil, foi implantado em 1999 em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Pan-Americano de Alimentos e Zoonoses (IPAAZ) da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS).

No que diz respeito aos custos, as DTAs representam um enorme impacto econômico. Dados do Sistema Único de Saúde (SUS) revelaram que no Paraná, os gastos pelo governo giram em torno de 2 milhões de reais/ano somente em internações devido às DTAs (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006) e em todo o país gasta-se em média 46 milhões de reais/ano (CARMO et al, 2005).

As bactérias, seres unicelulares, de estrutura procarionte, podem atuar de forma multicelular se algum nível populacional crítico for atingido (RUMJANEK; FONSECA; XAVIER, 2004). Na natureza, raramente as células crescem individualmente, de maneira planctônica (livres, em suspensão), sendo encontradas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo um biofilme, ou seja, um ecossistema microbiano estruturado altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

As bactérias estabelecem diferentes tipos de relações na natureza, porém os microrganismos que melhor se adaptam ao homem são os simbióticos, por protegerem seu hospedeiro de invasões por agentes patogênicos por tropismo, interferência ou anticorpos naturais. As bactérias patogênicas, por sua vez, utilizam vários mecanismos para garantir sua perpetuação no ambiente e nessa luta, a bactéria pode destruir o seu hospedeiro ou deixar sequelas anatomofuncionais de intensidade variável (GERMANO; GERMANO, 2011).

Em indústrias de alimentos é bem estabelecida a relação do potencial de transmissão de microrganismos patogênicos para os alimentos durante o seu

processamento e distribuição. Muitas bactérias patogênicas e deteriorantes de importância em alimentos são capazes de aderir a superfícies de ambientes de preparo e distribuição de alimentos e ainda permanecerem viáveis mesmo após a limpeza e desinfecção (SENGER; BIZANI, 2011).

A rota de contaminação através das superfícies é reconhecida como de grande necessidade de controle nas atividades rotineiras dos serviços de alimentação, de modo que tal controle pode ser alcançado através da implantação de um adequado programa de sanitização (MILLEZI, 2012).

Muitos são os microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares e entre as bactérias podem-se citar as produtoras de toxinas pré-formadas: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*; as produtoras de toxinas na luz intestinal: *Vibrio* spp, *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga e *E. coli* enterotóxica; invasoras do epitélio intestinal: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *E. coli* enteroinvasiva e *Listeria monocytogenes* (HOBBS; ROBERTS, 1999; BALBANI; BUTUGAN, 2001).

Na Tabela 1 estão representadas as principais características das bactérias patogênicas deste estudo, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, por serem formadoras de biofilme e possuir estratégias de sobrevivência em condições adversas, sendo assim, responsáveis por doenças veiculadas por alimentos.

Tabela 1. Caracterização das três espécies de bactérias patogênicas, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, formadoras de biofilmes, segundo GERMANO; GERMANO (2011).

AGENTE ETIOLÓGICO	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> patogênica
Morfologia	Gram-positivo, coco	Gram-positivo, bacilo curto	Gram-negativo, bacilo reto
Temperatura de crescimento	5.6°C a 50°C	0°C a 45°C	10°C a 45°C
Exigência de O₂	Anaeróbio facultativo	Anaeróbio facultativo	Anaeróbio facultativo
pH para multiplicação	4 a 9,8	4,3 a 9,6	4,4 a 9,5
Período de incubação	1 a 8h	4 a 21 dias	5 a 48h
Sinais e sintomas	náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, prostração	febre, cefaleia, náuseas, vômitos, abortos, meningite, encefalite e sepsis	dores abdominais, diarreia, vômitos, náuseas, cefaleia, mialgia.
Importância	contaminam os alimentos por manipulações incorretas e produz toxina termorresistente	provoca aborto. Sob refrigeração, pode se multiplicar lentamente (taxa de mortalidade de 30% nos infectados)	provoca colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica
Principais alimentos envolvidos	produtos cárneos, frango, produtos de confeitaria, doces e salgados; produtos muito manipulados	leite, queijo fresco, patê, pescados, produtos cárneos, vegetais	diversos alimentos, água
Fatores que contribuem para a ocorrência de surtos	contaminação dos alimentos por manipuladores, equipamentos, utensílios; manutenção de alimentos prontos em tempo/temperatura inadequados.	cozimento inadequado; falhas na pasteurização do leite; refrigeração prolongada.	contaminação por manipuladores, refrigeração insuficiente, cozimento inadequado, limpeza e desinfecção deficiente de equipamentos.

Fonte: Própria autoria

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria pertencente à família *Micrococcaceae* e é uma das 37 espécies do Gênero *Staphylococcus*. Caracteriza-se por ser um organismo anaeróbio facultativo, não esporulado e sem motilidade (MALHEIROS et al., 2009). À microscopia, suas células apresentam coloração Gram-positiva e formato esférico com diâmetro próximo a 1µm, por isso são designados cocos, os quais se agrupam em cachos e se diferenciam por produzir colônias de pigmentação dourada (BOTARO, 2012).

É considerado como eubactéria halotolerante, com capacidade de produzir enzimas extracelulares como coagulase, termonuclease e lipase, consideradas fatores de virulência (SANTOS et al., 2007). Pode crescer em ampla faixa de temperatura (5.6°C a 50°C), porém as enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46°C e as temperaturas mínimas e máximas de crescimento e de produção de toxinas podem variar de acordo com outros parâmetros, como por exemplo, sais, pH e atividade da água. Já o seu pH ótimo para o crescimento é de 6-7, embora resistam a um pH entre 4 a 10 (GERMANO; GERMANO, 2011; MILLEZI, 2012).

Os estafilococos causam doenças tanto por produção de toxinas quanto por multiplicação em tecidos, causando inflamações. A lesão típica de *S. aureus* é o abscesso, que geralmente sofre necrose central (furúnculos, celulites e espinhas), mas os organismos também podem se disseminar via corrente sanguínea, gerando infecções graves, de difícil tratamento como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia, intoxicações alimentares e outras (SANTOS et al., 2007).

As enterotoxinas produzidas por *S. aureus* pertencem a uma grande família de toxinas pirogênicas produzidas tanto por bactérias do Gênero *Staphylococcus*, como *Streptococcus*. Estas toxinas podem causar choque tóxico e estão comumente associadas com intoxicações alimentares e diversas formas de alergias e doenças autoimunes (BALABAN; RASOOLY, 2000). As toxinas são termoestáveis (MILLEZI, 2012) e uma mesma cepa de *S. aureus*, pode produzir mais de um tipo de toxina. As três exotoxinas clinicamente importantes são enterotoxina, toxina da síndrome do choque tóxico (que inclui febre, hipotensão e erupção cutânea) e a exfoliatina (caracterizada por febre e conhecida como síndrome da pele escaldada) (LEVINSON; WARREN, 2005). A enterotoxina, quando presente em populações elevadas (10^5 - 10^6 UFC mL⁻¹) e sob

condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e O₂), é produzida nos alimentos em período curto de incubação (1 a 8h) e quando ingerida, causa, em quantidades inferiores a 1µg, intoxicação alimentar, representados principalmente por vômitos e uma diarreia aquosa sem sangue (GERMANO; GERMANO, 2011). A intoxicação geralmente não é letal, sendo que a duração dos sintomas é de 1 a 2 dias, podendo evoluir para quadros mais severos, dependendo da susceptibilidade do indivíduo e age como um superantígeno dentro do trato gastrintestinal por estimular a liberação de grandes quantidades de interleucina dos macrófagos e células T auxiliares (NORMANNO et al., 2005). Devido às enterotoxinas serem resistentes ao calor, geralmente não são inativadas em cozimentos rápidos (SANTOS et al., 2007).

A produção de enterotoxinas não está restrita à espécie *S. aureus*. Estudos evidenciaram espécies coagulase negativas, capazes de produzir toxinas em condições laboratoriais, como *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus lentus* (PEREIRA et al., 2001). Este fato demonstrou que outras espécies de *Staphylococcus*, além de *S. aureus*, são capazes de produzir enterotoxinas, embora esta característica já tivesse sido relatada, também, para outras espécies coagulase positivas, como *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* (VALLE et al., 1990). Com base em métodos sorológicos, identificam-se sete enterotoxinas estafilocócicas, denominadas A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H e I, sendo que a enterotoxina do tipo A e D são os mais frequentemente associados à gastroenterite estafilocócica (DINGES et al., 2000). São proteínas simples, resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais, e são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, não sendo inativadas totalmente pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (JAY, 2005).

O Gênero *Staphylococcus*, em especial a espécie *S. aureus*, foi citado como a terceira mais importante causa de doenças microbianas transmitidas por alimentos notificados em todo o mundo (ZHANG; IANDALO; STEWART, 1998) e responsável por quase 45% de todas as toxinfecções registradas (NORMANNO et al., 2005). Por apresentar características ubiquitárias, a ocorrência de surtos é favorecida, já que *S. aureus* se encontra amplamente disseminado nos ambientes de circulação do ser humano, fazendo do homem seu principal reservatório devido à colonização das vias nasais, garganta, pele e cabelos, atingindo de forma persistente 20 a 30% dos indivíduos saudáveis (NORMANNO et al., 2007). Com isso, sua transmissão aos alimentos pode

ocorrer por meio de manipuladores (assintomáticos ou não) e por equipamentos e superfícies dos ambientes de produção de alimentos onde estes indivíduos realizam suas funções de trabalho (ARAGON-ALEGRO et al., 2007).

A contaminação microbiológica dos alimentos tem sido objeto de preocupação constante em diversos países. Nos Estados Unidos, *S. aureus* foi alvo de 9% das notificações de DTA em 1997 (OLSEN et al., 2000). No entanto, Mead et al. (1999) afirmam que como não há uma sistematização de relatos, estima-se que o número total seria 10 vezes maior que os notificados e que somente para o Gênero *Staphylococcus* há em torno de 185mil casos/ano somente nos Estados Unidos. No Japão, em 2009, dos 1048 surtos ocorridos, 41 foram causados por *S. aureus* (JAPÃO, 2009). Na França, *S. aureus* vem sendo o agente etiológico mais frequente de Intoxicação Alimentar Estafilocócica (IAE) nos últimos anos. Em 2008, 32% dos casos de IAE foram atribuídos à espécie, seguida de 31% em 2009. Em 2012, *S. aureus* foi responsável por 21% dos casos (SANITAIRE, 2012). No Brasil, entre os anos de 1999 e 2009, 21% das DTAs registradas foram causadas por *Staphylococcus*. No Estado do Rio Grande do Sul, entre 1999 e 2005, 12% das notificações foram por *S. aureus* (BRASIL, 2009).

Staphylococcus aureus forma facilmente biofilmes tanto em superfícies bióticas quanto abióticas, com isso adquire fator de virulência e maior resistência a sanitizantes (ARAGON-ALEGRO et al., 2007). Essa resistência a antimicrobianos torna-se um importante problema para as indústrias de alimentos, devido à circulação persistente dessas bactérias no ambiente e a possível contaminação de água e comida, agravando os problemas de saúde pública. No que se refere aos laticínios, a obtenção higiênica é um ponto crítico. Na pasteurização do leite, a enterotoxina estafilocócica não é inativada, podendo causar intoxicação alimentar ao consumidor. A contaminação cruzada ou recontaminação no processamento dos derivados do leite são fatores a serem considerados (PICOLI et al., 2006) assim como a alta incidência nos produtos a base de pesca (VÁSQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2014) e cárneos (NORMANNO et al., 2007), por serem de difícil remoção dos ambientes de processamento. Além disso, *S. aureus* é o patógeno mais comumente relacionado aos casos de mastite contagiosa bovina (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Dessa forma, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação são cruciais para a garantia de um produto de qualidade.

2.1.2 *Listeria monocytogenes*

O Gênero *Listeria* pertence à família *Listeriaceae* e compreende várias espécies, entre as quais se inclui *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii* e *Listeria grayi* (BARANCELLI et al., 2011a) além de *Listeria rocourtiae*, *Listeria fleischmannii* e *Listeria weihenstephanensis* (HALTER; NEUHAUS; SCHERER, 2013) e mais recentemente incluídas também ao Gênero, as espécies *Listeria aquática*, *Listeria floridensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria grandensis* e *Listeria riparia* (BAKKER et al., 2014). No entanto apenas *L. monocytogenes* é considerada patogênica para humanos (GERMANO; GERMANO, 2011).

Listeria monocytogenes é um bacilo Gram-positivo com extremidades arredondadas, anaeróbio facultativo, mede de 1,0 a 2,0 μ por 0,5 μ de diâmetro, não são formadoras de esporos ou cápsulas, podendo aparecer isoladas ou em cadeias curtas (RENIER; HÉBRAUD; DESVAUX, 2011). Toleram condições ambientais adversas, tais como temperaturas entre 0 a 45°C e apresentam motilidade por seus flagelos quando cultivadas entre 20 e 25°C e imóveis ou com fraca motilidade a 37°C caracterizada pelo formato de “guarda-chuva” quando cultivados em meio semi-sólido (GERMANO; GERMANO, 2011). São consideradas bactérias ubíquas, tolerantes a elevada concentração de cloreto de sódio, podendo resistir a pH entre 4,3 a 9,6, embora apresentem resultados para pH ótimo entre 6,0 a 8,0 (JAY, 2005). Com isso, tornam-se importantes referências de estudo pela dificuldade de controle desses patógenos na indústria de alimentos.

Os principais reservatórios de *L. monocytogenes* são o solo e a água, que podem contaminar os alimentos, por isso tem sido isolada de várias espécies de mamíferos, aves e peixes, hortaliças, água doce, esgoto e do material fecal onde as bactérias são liberadas (RYSER; DONNELLY, 2001). De acordo com Barancelli et al. (2011a), isso se explica pela facilidade em encontrar essas bactérias em alimentos de origem animal e vegetal, *in natura* ou processados, sendo que o leite e seus derivados estão entre os produtos alimentícios mais frequentemente envolvidos na transmissão de *L. monocytogenes*. Por estar presente no trato gastrointestinal dos animais, também é muito comum a contaminação da carcaça e cortes de carne na etapa de abate ou no processamento incorreto (ANDRADE et al., 2010).

A listeriose resulta, principalmente, da ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* e apresenta alta taxa de mortalidade por uma combinação de alguns fatores, tais como ausência de tratamento térmico que promova a destruição de *Listeria* ou a qualidade nutricional de alimentos que favoreçam seu crescimento (MEAD *et al.*, 1999), levando a uma infecção por listeriose, podendo se manifestar como (I) uma doença gastrointestinal leve não invasiva, que pode ser diagnosticada em adultos saudáveis, ou (II) uma doença invasiva que se manifesta como septicemia ou neuropática (RENIER; HÉBRAUD; DESVAUX, 2011). Indivíduos em condições suscetíveis demonstram altas taxas de contaminação por *L. monocytogenes* afetando principalmente os grupos de alto risco, incluindo pacientes imunocomprometidos, mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos (FARBER; PETERKIN, 1991).

Os principais sintomas da listeriose são meningite, encefalite, septicemia, gastroenterite, aborto ou nascimento prematuro (FORSYTHE, 2010). Diversas condições podem predispor a listeriose em pessoas adultas e dentre elas pode-se citar os neoplasmas, a AIDS, o alcoolismo, o diabetes tipo 1, as doenças cardiovasculares, os transplantes renais e as terapias com corticoides (JAY, 2005).

Surtos de listeriose já foram relatados em diversas localidades e como o período de incubação é de 3 a 70 dias (FRETZ *et al.*, 2010) há uma dificuldade em identificar o agente causador e rastrear a origem da contaminação do alimento (BARANCELLI *et al.*, 2011b). Nos EUA, para cada 2.500 casos registrados de enfermidades transmitidas por alimentos por ano (as DTAs), 500 destes são fatais (MEAD, 1999). No ano de 2006 foram registrados 138 casos de listeriose no país, com um custo anual estimado em 2,3 bilhões de dólares para os casos agudos e mortalidade em torno de 20 a 30% (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008). Em 2007, houve um surto em Massachusetts atribuído ao consumo de leite pasteurizado contaminado que acometeu 5 pessoas resultando em 3 mortes (CDC, 2015a). Na Áustria e Alemanha, ocorreu um surto em 2009 de listeriose, atribuído ao consumo de queijo tipo “Quargel” com 12 e 92 notificações respectivamente, resultando em 2 mortes para cada país, sendo todos idosos acima de 70 anos (FRETZ *et al.*, 2010). Dados de 2010 a 2015 relataram um total de 10 pessoas infectadas com listeriose, após a ingestão de sorvete, nos estados de Arizona (1), Kansas (5), Oklahoma (1) e Texas (3) ocorrendo 3 mortes no Kansas (CDC, 2015b).

A ocorrência de listeriose de origem alimentar é relatada principalmente em países industrializados, com pouco ou nenhum relato em países em desenvolvimento. No Brasil, pela falta de sistemas de pesquisa e informação de dados, a notificação de

casos de listeriose não é compulsória, o que dificulta mostrar a magnitude do problema, embora *L. monocytogenes* esteja comprovadamente presente em diversos produtos, sobretudo em derivados cárneos (SILVA et al., 2004) e lácteos (CARVALHO et al., 2007). Os registros de listeriose mais atuais no Brasil incluem um achado de presença de *L. monocytogenes* em 50 das 148 placentas humanas relacionadas a abortos e partos pré-maturos em Porto Alegre (SCHWAB; EDELWEISS, 2003), um caso de pneumonia em adolescente acometida de cirrose (DE SÁ et al., 2004) e casos de peritonite bacteriana espontânea em idosos portadores de cirrose (TOYOSHIMA et al., 2006).

L. monocytogenes também são formadores de biofilmes, aderindo a superfícies de contato com alimentos, tais como vidro, metal (aço inoxidável), borracha e polipropileno sendo de difícil descontaminação permitindo sua persistência por longos períodos no ambiente de processamento, podendo assim provocar contaminações recorrentes no produto final (TESSEMA et al., 2009). A dificuldade em eliminar esse microrganismo das indústrias é potencializada pelas condições de umidade, temperatura e presença de matéria orgânica nas plantas de processamento, que aliadas à habilidade do patógeno em produzir biofilmes, podem desencadear a colonização de superfícies de equipamentos e utensílios (BERALDO et al., 2013). Há estudos publicados com foco na sobrevivência em condições adversas e mecanismos de adaptação (RENIER; HÉBRAUD; DESVAUX, 2011), além de resistência a antimicrobianos (JADHAV et al., 2013) e controle da bactéria em indústrias de alimentos (BARANCELLI et al., 2011b) pelo fato de ser uma bactéria que não forma esporos e ter grande resistência aos efeitos de congelamento, aquecimento, dessecação e sanitização (FATEMI; FRANK, 1999) tornando-a importante foco de estudo na busca por sanitizantes com maior eficiência de sua eliminação a fim de evitar as contaminações alimentares.

2.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é considerada bactéria patogênica tanto para o homem quanto para os animais. Pertence à Família *Enterobacteriaceae* e ao Gênero *Escherichia* e é uma bactéria Gram-negativa, com bacilos de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6,0 µm de diâmetro, anaeróbia facultativa (mais abundante no cólon e nas fezes) e não esporulante (DIAS et al., 2012). São considerados como um dos microrganismos mais versáteis encontrados na natureza, podendo apresentar cápsulas (MILLEZI, 2012), além de terem capacidade

de motilidade, possuindo flagelos peritríquios e crescerem a temperaturas entre 10 a 45°C, com pH de multiplicação variando entre 4,4 a 9,5 (GERMANO; GERMANO, 2011).

É amplamente distribuída na microbiota de humanos e animais de sangue quente, colonizando o trato gastrointestinal, onde estabelece uma relação mutuamente benéfica com seu hospedeiro (GARCIA et al., 2008). Geralmente é um comensal inofensivo, mas várias cepas podem apresentar características patogênicas mortais em humanos e animais, devido a sua grande diversidade genética e notável plasticidade ecológica, podendo se adaptar rapidamente a ambientes diferentes (DIAS et al., 2012). Cepas de *E. coli* associadas à infecção intestinal, são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas e estão agrupadas em seis categorias, considerando os seus mecanismos de virulência específicos: *E. coli* patogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC ou EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (MENG; FENG; DOYLE, 2001). A transmissão das infecções causadas por *E. coli* seguem principalmente três vias: (I) o contato direto com animais, (II) o contato com humanos e (III) o consumo de alimentos contaminados, sendo estes geralmente relacionados com o contato com contaminação fecal (RISSATO et al., 2012) ou contato com superfícies contaminadas (MILLEZI, 2012).

ETEC são cepas de *E. coli* que produzem toxina termoestável e/ou toxina termolábil. A infecção por cepas de ETEC é causa significativa de diarreia em crianças e viajantes de países desenvolvidos para países em desenvolvimento, bem como de colibacilose em animais jovens, principalmente leitões e bezerros (NAGY; FEKETE, 2005). Almeida et al. (2007) verificou que das 223 amostras de fezes de suínos diarreicos de suinoculturas da região de Ribeirão Preto/SP, 60 (27,7%) e das 25 amostras isoladas de suínos normais, 4 (16,7%) estavam contaminadas por ETEC, acarretando em perdas econômicas.

O desenvolvimento de diarreia por ETEC depende de dois fatores importantes: produção de enterotoxina e colonização do intestino delgado através dos fatores de colonização (MENG; FENG; DOYLE, 2001). Segundo Menezes et al. (2003), ETEC é responsável por cerca de 20% dos casos de diarreia em crianças, no Brasil.

Os principais alimentos contaminados por *E. coli* são leite não pasteurizado, água contaminada, carne crua e seus derivados (RISSATO et al., 2012). A infecção alimentar ocorre quando o microrganismo é ingerido e se multiplica no organismo,

causando as doenças que acometem o trato gastrointestinal (MILLEZI, 2012). Desta forma, as práticas de higiene e segurança alimentar são importantes para a prevenção dessas contaminações.

Quando duas ou mais pessoas têm a mesma doença a partir do mesmo alimento ou bebida contaminada, o evento é chamado de surto de origem alimentar e por isso é importante se investigar a origem dos surtos e controlá-los para evitar que mais pessoas adoçam. A gastroenterite transmitida por *E. coli* atinge indivíduos jovens, idosos e imunodeficientes com maior severidade, havendo a necessidade de controle da presença desses agentes em alimentos, principalmente os de origem animal (RISSATO et al., 2012), assim como controlar a formação de biofilmes, cujas linhagens se formam nas mais variadas superfícies, desde polipropileno até dispositivos cirúrgicos (SILVA; MARTINIS, 2013). Essa adesão a superfícies, segundo Boari et al (2009), é devido aos fatores de virulência dessa bactéria Gram-negativa, que apresentam vantagem sobre as Gram-positivas, ou seja, quanto mais hidrofóbica for a célula bacteriana maior sua capacidade de aderência, colonização das superfícies (aço inoxidável, plásticos, vidros etc) e consequentemente, formação de biofilmes.

Registros recentes de ocorrência de surtos registrou nos EUA em 2013, um total de 33 pessoas infectadas por ETEC O157 em quatro estados: Arizona (1), Califórnia (28), Texas (1), e Washington (3), ao ingerir salada com pimentão e frango grelhado de uma marca industrializada de origem mexicana. Duas pessoas desenvolveram Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU) e nenhuma morte foi relatada. No ano de 2014, um total de 19 pessoas tiveram infecção por ETEC O121, após consumirem brotos (saladas) do mesmo lote de uma marca industrializada. Embora haja controle, a *E. coli* é ainda uma importante causa de doença em humanos nos Estados Unidos (CDC, 2015b). No Brasil, no período de 2006 a 2007, o Estado do Rio Grande do Sul obteve 44% de contaminação por *E. coli* nas notificações por DTAs (WELKER et al., 2010).

Por ser de origem fecal, a *E. coli* é usada como indicador de qualidade da água e de ambiente de processamento de alimentos (VAN HOUDT; MICHIELS, 2005), sendo então sua importância de estudo relacionada com o seu potencial patogênico e a resistência a antimicrobianos. Frente a estas preocupações, diversos estudos já foram realizados, tais como os relacionados à adesão em superfícies e resistência por *E. coli* em cupons de aço inoxidável (RYU; BEACHAT, 2005), em polietileno (TERADA et al., 2012) e policloreto de vinila (PVC) (BAN et al., 2012), assim como a resistência desses microrganismos a óleos essenciais (SILVA et al., 2009) e resistência a

sanitizantes químicos (SILVA et al., 2003; NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010; BELTRAME et al., 2012). Com isso, é importante que se faça pesquisas com métodos padronizados, para efeitos de comparação e novas tomadas de decisão no uso de sanitizantes que contribuam no controle efetivo desses microrganismos na indústria de alimentos.

2.2 Biofilmes bacterianos

Na natureza, os microrganismos podem ser encontrados livres, em seu estado planctônico, ou em comunidades organizadas denominadas biofilmes. No entanto, as bactérias planctônicas têm uma propensão inata de aderir a superfícies, crescer em comunidades e formar uma importante biomassa presente na natureza, denominada de biofilme (SANTOS, 2009). Estudos realizados no ambiente marinho demonstraram que o número de bactérias aderidas à superfície era significativamente maior que no meio circundante (DONG; ZHANG, 2005).

Biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis, onde colonizadores primários aderem a uma superfície contendo proteínas ou compostos orgânicos (glicocálix) e as células aderidas se desenvolvem, originando microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica, que serve de substrato para a aderência dos microrganismos secundários, podendo se agregar com outros microrganismos e formar uma colônia (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1997).

Vários fatores estão relacionados à formação de biofilmes, destacando-se as características físico-químicas do material sobre o qual estão aderidos, tais como o pH, a concentração, a biodisponibilidade de nutrientes, a temperatura, a presença de compostos orgânicos e inorgânicos (MILLER; BASSLER, 2001) e os fatores de virulência por parte dos microrganismos, como a produção da cápsula exopolimérica e fímbrias (SANTOS, 2009). Esse estilo de vida coletiva se caracteriza como um “*quorum*” (RUMJANEK; FONSECA; XAVIER, 2004), onde as ações tomadas em conjunto favorecem a migração desses biofilmes para ambientes com maior oferta de nutrientes (MIGUEL, 2007), adoção de novos modelos de crescimento, troca de material genético entre si e sua modificação em resposta ao ambiente por *Quorum Sensing* (DONG; ZHANG, 2005; ATKINSON et al., 2006), além de que essas EPS lhes

confere proteção contra Radiação UV, predação, desidratação e agentes antimicrobianos (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

Figura 1. Fases de desenvolvimento da formação de um biofilme, onde em a) ocorre a colonização primária em substrato com nutrientes; b) as células se reproduzem, formando microcolônias com a formação da matriz exopolimérica (EPS); c) células secundárias aderem às microcolônias; d) formação do biofilme contendo multiespécies maduras

Devido ao seu envolvimento numa vasta gama de atividades humanas, o objetivo de controlar biofilmes é comum a várias áreas de investigação. O prejuízo na área médica ocorre com o aumento dos riscos de infecção humana, pois segundo Pinheiro (2006), os biofilmes se desenvolvem na superfície de diferentes artigos médico-hospitalares (lentes de contato, cateteres vasculares, agulhas, conexões, tubos endotraqueais, cateteres vesicais, cateteres de diálise peritoneal e em próteses).

As infecções constituem amplo ou grave problema de saúde pública tanto para os países em desenvolvimento quanto para os chamados países de 1º Mundo (FORATTINI, 2004). As doenças associadas a biofilmes constituem 65 a 80% das infecções tratadas em países desenvolvidos (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1997), sendo que o Gênero *Staphylococcus* é a causa mais frequente de biofilmes associados a infecções, por serem comensais da pele humana e superfícies mucosas (OTTO, 2008).

No que tange à saúde pública, o conhecimento sobre a ocorrência de biofilmes microbianos no organismo humano leva a mudanças de tratamento das doenças

infecciosas, precisando desse maior conhecimento para poder empregar os antibióticos de forma mais eficaz. De acordo com Davey; O'Toole (2000) o tratamento de doenças infecciosas com antibióticos é ineficaz em duas situações: 1) com organismos exibindo resistência inata à droga e 2) em bactérias presentes em biofilmes. Dentre os possíveis mecanismos, acredita-se que possa haver a inativação da droga por polímeros ou enzimas extracelulares, ou a ineficiência da droga em decorrência de taxas de crescimento muito lentas no interior dos biofilmes. Exemplos típicos de doenças associadas a biofilmes incluem as infecções de implantes, tais como válvulas cardíacas, cateteres, lentes de contato e pulmonares.

Bactérias em biofilmes tem maior resistência a agentes antimicrobianos, além de se proteger contra o sistema imune do hospedeiro (MACHADO, 2006). Infecções associadas a biofilmes geralmente são de natureza recorrente, visto que as terapias antimicrobianas convencionais eliminam predominantemente as formas planctônicas (GILBERT; FOLEY, 1997; DRENKARD, 2003) deixando as células sésseis livres para se reproduzir e propagar no biofilme após o tratamento (CAPELLETTI, 2006).

Microrganismos dentro de uma indústria de alimentos podem ser considerados transientes ou persistentes, dependendo do tempo que permanecem dentro das instalações. Microrganismos transientes permanecem pouco tempo nas indústrias porque são facilmente retirados pelos processos de higienização, contudo os microrganismos persistentes dificilmente são removidos, uma vez que colonizam locais onde geralmente a limpeza e a desinfecção não alcançam. Esses microrganismos podem contaminar grandes quantidades de alimentos principalmente se estiverem protegidos em biofilmes ou envolvidos por resíduos de alimentos (MALHEIROS et al., 2009).

Segundo alguns autores, para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de células aderidas por cm^2 . Andrade; Bridgeman; Zottola (1998) consideram um número mínimo de células aderidas de 10^7 UFC/ cm^2 , enquanto Ronner; Wong (1993) consideram 10^5 por cm^2 e Wirtanen; Husmark; Mattila-Sandholm (1996) consideram 10^3 por cm^2 . Parida (1998) defende que para ser considerado biofilme, o número de células aderidas deve estar entre 10^6 e 10^7 UFC/ cm^2 e que abaixo desses valores é considerado um processo de adesão bacteriana e não uma formação de biofilme.

Estudos demonstram que *L. monocytogenes* apresenta a capacidade de sobreviver em biofilmes e persistir em plantas de processamento de alimentos (RATTI et al., 2010), ocorrendo em leite e derivados (BARANCELLI et al., 2011a), sendo o

leite pasteurizado apontado como maior risco de transmitir listeriose na população (BARANCELLI et al., 2011b). Em média, os sanitizantes reduzem 2 a 4log UFC/cm² de *L. monocytogenes* em biofilme, dependendo do estágio em que esse se encontra e da superfície e substrato em que foi produzido (YANG; DIEZ-GONZALEZ; FEIRTAG, 2013). Quanto a *S. aureus*, estudos demonstram que o simples contato de carne de frango com superfícies de aço inoxidável ou poliestireno pode transferir cerca de 4log UFC/cm² desse microrganismo para essas superfícies (MALHEIROS et al., 2009). Já *E. coli*, em sua forma patogênica, acomete o ser humano desenvolvendo a colite hemorrágica através de alimentos contaminados (SILVA et al., 2003) e também apresentam forte tendência na formação de biofilmes (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005).

Existem preocupações com o uso de sanitizantes na eliminação de biofilmes, incluindo a seleção de bactérias resistentes e reações químicas entre estes compostos e a superfície dos equipamentos (CERETTA, 2008). Com isso, a formação de biofilmes da indústria de alimentos merece atenção e um estudo que venha de encontro com os interesses econômicos tanto da indústria quanto do consumidor.

Uma característica importante para a aderência dos microrganismos em superfícies é a carga elétrica e a rugosidade. O aço inoxidável é o material mais escolhido para superfícies de trabalho nas indústrias de alimentos, devido a suas características, tais como força mecânica e durabilidade. O cromo do aço inoxidável tem grande afinidade com o O₂ formando uma fina camada polida, resistente à corrosão e, portanto, hidrofóbico (HAYES, 1993). Neste contexto, em se tratando de adesão inicial, quanto mais hidrofóbica for a célula bacteriana, maior será sua capacidade de se ligar diretamente a esta superfície, com isso bactérias Gram-negativas apresentariam uma vantagem competitiva em relação às Gram-positivas não somente na adesão inicial, mas também na colonização de superfícies e formação de biofilmes (BOARI et al., 2009). O polímero ou poliestireno possui sua superfície lisa e, portanto, hidrofóbica, sendo esse material bastante utilizado pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas e hospitalares. A adesão microbiana se torna melhor com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão (CABEÇA, 2006). Hancock; Ferrières; Klemm (2007) demonstraram que infecções crônicas em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) estão associadas ao uso de cateteres. Os biofilmes formados também nas superfícies dos instrumentos se tornam inconvenientes, pois acabam por se implantar nessas superfícies, propiciando espaço e condições para a proliferação de

microrganismos tanto patogênicos quanto deteriorantes e, além disso, os microrganismos formadores de biofilmes podem gerar a corrosão das superfícies de tais equipamentos, reduzindo sua vida útil (TIBA; NOGUEIRA; LEITE, 2009).

Cabeça (2006) cita que as superfícies de aço inoxidável são reconhecidas como as principais fontes de contaminação microbiana enquanto que Rossoni; Gaylarde (2000) afirmam que o aço inoxidável é mais facilmente desinfetado em comparação com o poliestireno. Diante do exposto, este estudo avaliou a formação dos biofilmes em laboratório nas superfícies de aço inoxidável e poliestireno e sua ação frente aos sanitizantes comerciais e a OLE.

2.3 Procedimentos para higienização de superfícies na indústria de alimentos

2.3.1 Aspectos gerais

O controle dos microrganismos na indústria de alimentos é de fundamental importância para assegurar a qualidade do produto e evitar a contaminação alimentar do consumidor. De acordo com Evangelista (2003), o primeiro ponto a ser levantado é que é imprescindível a aplicação de programas de gerenciamento da qualidade na indústria de alimentos, tais como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Higienização é a ação combinatória da limpeza e sanitização e não pode interferir nas propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos, oferecer riscos à saúde humana ou prejuízos financeiros ao consumidor e indústria (GERMANO; GERMANO, 2011). A limpeza é responsável pela eliminação de partículas indesejáveis, obtida por meios físicos e químicos, assim como pela remoção das contaminações visíveis da superfície, que servem de abrigo para o desenvolvimento dos microrganismos. A sanitização é responsável pelo restante de microrganismos que permanecem após a limpeza e tem por ação reduzir ou eliminar completamente a presença de microrganismos de importância higiênico-sanitária em superfícies (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010), sendo a maioria desses relacionada à formação de biofilmes e diversos microrganismos deteriorantes ou patogênicos (SHI; ZHU, 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

2.3.2 Dificuldades para higienização de biofilmes em superfícies

As atividades dos biofilmes para a indústria de alimentos podem ser classificadas como benéficas ou prejudiciais. Dentre os benefícios estão a produção de fermentados, o tratamento de efluentes e de água potável e a produção de biopolímeros para usos diversos. Já em relação aos prejuízos para a indústria, além da degradação dos alimentos e redução do tempo de prateleira, a formação dos biofilmes em utensílios e superfícies são fonte crônica de contaminação e de difícil remoção (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

A maior ou menor adesão microbiana depende de características macro e microscópicas, refletindo na contaminação de alimentos por microrganismos alteradores ou patogênicos (HAUN, 2004) posto que os biofilmes constituem uma barreira de proteção contra detergentes e sanitizantes, podendo neutralizá-los pela matriz polimérica, já que são constituídas por matéria orgânica e essa resistência dos biofilmes podem causar não apenas a contaminação alimentar, mas também outras contaminações prejudiciais, como por exemplo entupir tubulações, atrasar o tempo de processamento nas plantas ou iniciar a corrosão de equipamentos (ROSSI; PORTO, 2009).

Após atingir uma determinada massa crítica e um equilíbrio dinâmico, as camadas exteriores do biofilme começam a libertar células em estado planctônico novamente, que poderá rapidamente se dispersar, multiplicar e até aderir a novas superfícies formando outros biofilmes noutros locais (MORAES et al., 1997). Por sua vez, o fenômeno de conjugação definido como de transferência de plasmídeos, demonstra ter maior ocorrência entre células de biofilmes do que entre células livres (MIGUEL, 2007).

Biocidas possuem agentes ativos e previnem, inibem, diminuem ou eliminam a ação de organismos vivos (patogênicos ou não) e são classificados em dois grupos: oxidantes, mais usados na indústria de alimentos (ozônio, peróxido de hidrogênio, compostos de cloro) e não oxidantes (compostos sulfurados, estanho, isotiazolinonas, sais de cobre, aldeídos, sais quaternários de amônio) (CAPELETTI, 2006). Estes sanitizantes apresentam uma comprovada eficiência sobre as formas livres bacterianas nas condições recomendadas para uso nas indústrias de alimentos. Nessas condições, normalmente, obtêm-se 5 reduções decimais em 30 segundos de contato na população de células planctônicas de *S. aureus* e de *E. coli*, quando submetidos ao teste de suspensão (SCHEUSNER, 1982). No entanto, em muitos procedimentos usados na

indústria de alimentos, essas soluções sanitizantes não reduzem, até níveis considerados seguros, a população de esporos considerados mais resistentes (MORAES et al., 1997), tornando-se necessário pesquisar novos tipos de sanitizantes que venham a reduzir ao máximo os esporos garantindo qualidade e segurança dos alimentos (Figura 2).

Figura 2: Esquematisação da persistência do biofilme após a sanitização, onde inicialmente as moléculas orgânicas de alimento são depositadas na superfície do material e formam uma película. Depois os microrganismos biologicamente ativos são atraídos para as moléculas orgânicas e, por último, as células microbianas persistentes permanecerão após a limpeza e sanitização, reiniciando o crescimento e formação do biofilme, com a expressão celular de genes e *quorum sensing*.

Fonte: SHI; ZHU (2009).

Os sanitizantes químicos são utilizados para redução do número de microrganismos aderidos nas instalações, em um nível que evite a contaminação do alimento. Os mais utilizados pelas indústrias de produtos lácteos, produtos cárneos, produtos de panificação e outras, são o ácido peracético, os quaternários de amônia e o digluconato de clorexidina, regulamentados pela Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988, publicada no Diário Oficial da União em 5 de setembro de 1988, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1988). O órgão responsável pela avaliação laboratorial e comprovação da eficácia desses sanitizantes é o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), do Ministério da Saúde (SALUSTIANO, 2002).

Como as análises sobre a composição dos biofilmes são difíceis de realizar devido à constante alteração do microcosmo e os dados laboratoriais são

frequentemente enganadores, porque os biofilmes são geralmente formados utilizando meios de cultura ricos (SUTHERLAND et al., 2004), os problemas que eles causam se agravam por sua resistência, o que constitui uma barreira de proteção contra os métodos de desinfecção e higienização, posto que os métodos convencionais não são suficientes e requerem por vezes doses elevadas de sanitizantes (JASS; SURMAN; WALKER, 2003). A busca por um novo produto que reduza ao máximo os esporos, poderá garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, associado à minimização dos prejuízos econômicos e da saúde humana. A oleuropeína, um éster composto de tirosol e ácido elenólico (CHAROENPRASERT; MITCHELL, 2012), caracteriza-se por ser inodora e atóxica além de ser agente com propriedades antimicrobianas para *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* (TRIPOLI et al., 2005) pode ser um novo agente sanitizante. Esta pesquisa avaliou a eficiência dos sanitizantes mais utilizados e comparou com a oleuropeína, para saber se esta pode ser utilizada na indústria de alimentos contra as bactérias patogênicas testadas.

2.4 Sanitizantes químicos comerciais

O uso de sanitizantes, etapa complementar da higienização, tem por função eliminar os microrganismos patogênicos e reduzir a níveis aceitáveis os deteriorantes. A sanificação eficiente previne contaminações posteriores e serve para assegurar a qualidade microbiológica das superfícies, devendo ser realizada antes do uso dos equipamentos para evitar a multiplicação de organismos indesejáveis (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010). A ação dos sanitizantes é afetada tanto pelas características físico-químicas da superfície, tais como tipos de resíduos presentes, concentração, tempo e temperatura de contato, pH, quanto pelo tipo e concentração dos microrganismos contaminantes, como por exemplo os esporos que são mais resistentes que as células vegetativas ou ainda sanitizantes que sejam mais efetivos sobre bactérias Gram-negativas do que para as Gram-positivas (ANDRADE, 2008).

A ANVISA, através da portaria nº 15, de 23 de Agosto de 1988 define, classifica, regulamenta e estabelece os parâmetros de emprego dos sanitizantes com finalidade antimicrobiana, sendo consideradas desinfetantes as formulações que possuem na sua composição substâncias microbiocidas e apresentam efeito letal para microrganismos não esporulados (*S. aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Tricophyton mentagrophytes*, *Mycobacterium amegmatis* e *Mycobacterium bovis*) e considerados esterilizantes, as formulações que possuem na sua composição substâncias microbiocidas com efeito letal para microrganismos esporulados *Bacillus subtilis* e *Clostridium sporogenes*.

Segundo a Portaria 101 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 11 de agosto de 1993:

O termo "desinfetante" é comumente empregado para designar substâncias capazes de destruir microrganismos patogênicos não esporulados em curto espaço de tempo, quando aplicado a objetos inanimados. Sanitizantes são desinfetantes que reduzem o número de microrganismos a níveis considerados seguros para a saúde pública. Porém, como a grande maioria dos produtos comercializados encontram-se rotulados como "desinfetante", qualquer germe patogênico que se mostrar resistente ao desinfetante na maior diluição recomendada pelo fabricante, é motivo de reprovação.

(BRASIL, 1993)

Spreer (1991) demonstrou que o mecanismo de ação dos sanitizantes inclui: impedimento do metabolismo celular pelo bloqueio da membrana, coagulação das proteínas celulares, dissolução de substâncias celulares, lesão irreversível e alteração da pressão osmótica dos microrganismos. Na maioria das vezes, os agentes sanitizantes eliminam mais facilmente as formas vegetativas bacterianas, mesmo em baixas concentrações, no entanto o mesmo não ocorre para esporos bacterianos que são muito mais resistentes. Com isso, para elevar a eficiência das soluções sanitizantes é feita uma combinação de fatores, tais como: aumento da concentração do sanitizante, aumento do tempo de contato, aumento da temperatura de contato, ajuste do pH, entre outras medidas.

Os sanitizantes deveriam apresentar baixa toxicidade e corrosividade, serem estáveis nas mais diversas condições de uso, possuir amplo espectro de ação antimicrobiana, destruir rapidamente os agentes e ser aprovado pelos órgãos de fiscalização (Ministério da Saúde), porém ainda não existe um único produto com todas essas características e sim específicos e mais adequados para cada aplicação (ANDRADE, 2008). Dos agentes químicos selecionados para o experimento deste estudo, seguem descritos abaixo as características de cada um.

O ácido peracético (APA) é o princípio ativo de diversos sanitizantes comerciais destinados ao procedimento de higienização na indústria de alimentos. Resulta da oxidação do acetaldeído ou de uma mistura estabilizada de ácido peracético, peróxido

de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante. Tem odor forte e baixo pH (2,8) e normalmente é produzido em concentrações entre 2 e 15% (SREY; JAHID; HÁ, 2013). É capaz de oxidar tanto a matéria orgânica quanto inorgânica, como fenóis, cetonas, aminas e compostos dissulfídricos. Por ser um forte oxidante, atua na parede celular e no interior da célula microbiana o que danifica o sistema enzimático causando a destruição do microrganismo (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

O peróxido de hidrogênio (PH) é um forte oxidante devido à liberação do oxigênio, seu pH é 4,0, utilizado há décadas como agente bactericida em concentrações mais baixas. Atua sobre células vegetativas pelo processo de forte oxidação dos componentes celulares e para agir como esporocida, há necessidade do uso de concentrações mais elevadas (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

O hipoclorito de sódio (HS) pertence aos compostos clorados e é o único sanitizante desse grupo que é permitido pela legislação brasileira. Atua melhor em ambientes de pH ácido. Com a destruição da cápsula bacteriana de proteção e oxidação do protoplasma celular exercem a sua ação sanitizante, formando cloraminas tóxicas que alteram a permeabilidade celular e impedem a regeneração enzimática (SREBERNICH, 2007).

O digluconato de clorexidina (DC), pertence ao composto de amônia quaternária, sendo um agente oxidante forte que, quando em contato com a membrana celular dos microrganismos, alteram sua permeabilidade estimulando a glicólise e provocando assim um esgotamento celular. Atuam com mais eficiência contra bactérias Gram-positivas e possuem menor ação contra fungos filamentosos. Pode ser inativada por precipitação de sais minerais. As soluções aquosas desse germicida não possuem cor e odor (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

O cloreto de benzalcônio (CB), também chamado sal de amônio quaternário, é uma classe de compostos orgânicos, caracterizados por possuírem o grupo $R_4 N^+Cl^-$, sendo uma mistura de compostos de alquil benzil dimetil de amônio, substância tensoativa catiônica, de baixa tensão superficial, utilizado como um agente antimicrobiano que aumenta a permeabilidade da membrana celular dos microrganismos, possibilitando a hidratação das células e sua implosão com perda de nitrogênio e potássio, inativando o sistema enzimático bacteriano. É usado na indústria devido a sua capacidade de desinfecção, sendo especialmente eficaz entre pH 6 e 8. Atuam contra bactérias, leveduras, fungos, algas, líquens e organismos formadores de biofilme, quando usado em concentrações de 1 a 2% (MARRIOTT, 1999).

O iodoform (IO) tem alto poder de penetração na parede celular, levando a ruptura de proteínas. O iodo é eficiente em baixas soluções, porém uma das inviabilidades de seu uso na indústria de alimentos é por sua cor que pode manchar o material plástico e também pode alterar o odor ou sabor dos alimentos (MONTEIRO et al., 2001).

A tabela 2 apresenta um resumo das vantagens e desvantagens de uso dos agentes químicos (sanitizantes) utilizados na indústria de alimentos usados neste estudo.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens dos sanitizantes químicos mais utilizados na indústria de alimentos.

Agente químico	Vantagens	Desvantagens
Ácido Peracético (APA) – (2%)	<ul style="list-style-type: none"> - Esporicida em baixas temperaturas - Permanece ativo na presença de matéria orgânica - Eficiente na eliminação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos filamentosos, leveduras, vírus e esporos bacterianos 	<ul style="list-style-type: none"> - Poder corrosivo ao aço inoxidável, em altas concentrações - Irritante à pele e mucosas - Custo elevado
Peróxido de Hidrogênio (PH) – (3%)	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas - Baixa toxicidade - Baixo efeito residual - É eficiente contra biofilmes maduros 	<ul style="list-style-type: none"> - Corrosiva ao cobre, zinco e bronze - Requer precaução no manuseio e dosagem
Hipoclorito de Sódio (HS) – (2%)	<ul style="list-style-type: none"> - De baixo valor comercial (baixo custo) - Agente antimicrobiano no combate a biofilmes 	<ul style="list-style-type: none"> - Altamente corrosivo, carcinogênico e irritante de pele, mucosas e vias respiratórias dos manipuladores - É inativado na presença de compostos orgânicos
Iodoform (IO) – (2%)	<ul style="list-style-type: none"> - Menos corrosivo aos metais - alto poder de penetração na parede celular - pouco irritante a pele - ativo em baixa concentração 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo - pode alterar o odor ou o sabor dos alimentos - pode manchar material plástico - Diminui a eficiência com a elevação do pH
Cloreto de Benzalcônio (CB) – (1%)	<ul style="list-style-type: none"> - age nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas - pouco corrosivo e pouco tóxicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Fica comprometida na presença de matéria orgânica e quando as superfícies de adesão são pré-tratadas com surfactante
Digluconato de Clorexidina (DC) – 2%	<ul style="list-style-type: none"> - baixa toxicidade - age nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas - neutralizam odores 	<ul style="list-style-type: none"> - Custo elevado - Pouco eficiente em meio ácido e em contato com proteínas - Instabilidade durante a produção e estocagem

Fonte: ANDRADE; MACÊDO (1996); MARRIOTT (1999); ANDRADE (2008); NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC (2010); NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010); SREY; JAHID; HÁ (2013).

2.5 Oleuropeína

Os sanitizantes químicos tradicionais utilizados na indústria de alimentos apresentam, como desvantagem, o possível desenvolvimento de resistência e adaptação bacteriana, interferindo na eficiência bactericida mínima destes produtos e o prejuízo à saúde dos manipuladores (Tabela 2). Com isso, a flora natural mundial desperta interesse em áreas multidisciplinares sobre a eficácia de seus componentes e sua possível utilização como princípios ativos de sanitizantes (BERALDO et al., 2013).

A Oliveira, uma das árvores mais citadas na literatura botânica, tem sido alvo de estudos a nível médico e culinário, sendo que seus primeiros estudos datam de 1854, quando o pó da folha de Oliveira foi estudado para o tratamento da febre e da malária (LEE-HUANG et al., 2003). Caracteriza-se por ser uma dicotiledônea, de vida longa, pertencente à família das oleáceas (do latim *olivum*), do gênero *Olea* e da espécie *Olea europaea* L. e ocupa uma superfície de 8 milhões de hectares, o que demonstra a sua importância a nível econômico e social por seu fruto (azeitona) e pelo azeite, utilizados na culinária (FERREIRA et al., 2007).

Os compostos fenólicos (biofenóis) são metabolitos secundários sintetizados e presentes em toda a planta, face à agressão por microrganismos e radiações ultravioleta. Deles fazem parte os pertencentes à família dos secoiridóides, sendo o mais abundante a oleuropeína, seguida de outros fenóis mais simples, como é o caso do hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), do tirosol (3-hidroxifeniletanol), do ácido vanílico, do ácido p-cumárico e do ácido cafeico (MICOL et al., 2005), caracterizando suas atividades biológicas a estes compostos.

A oleuropeína (OLE) foi descoberta em 1908 por Bourquelet e Vintilesco (RANALLI et al., 2006) e é o composto mais abundante presente não somente nas folhas, os quais representa cerca de 73% da totalidade de seus compostos (PEREIRA et al., 2007), mas também na casca, nos frutos e nas raízes da árvore de Oliveira.

A oleuropeína ($C_{25}H_{32}O_{13}$), é um éster heterocíclico, glicosídeo secoiridoide esterificado com um álcool de fenilpropanoide, atóxico e é formada quimicamente por ácido metil éster (4S, 5E, 6S)-4-[2-[2-(3,4-diidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil]-5-etilideno-6-[[[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-2-tetrahidropirani]oxy]-4H-pirano-3- carboxílico. Bioquimicamente, o hidroxitirosol ($C_8H_{10}O_3$) é formado a partir da oleuropeína (Figura 3), sendo este o seu metabólito mais importante, que por ação

das enzimas b-glicosidases, que retiram a molécula da glicose da estrutura, formam o ácido elenólico que se subdivide em tirosol e hidroxitirosol (VISIOLI; BELLOMO; GALLI, 1998).

Apesar da importância que o hidroxitirosol assume, esta molécula não está disponível no mercado. As suas propriedades antioxidantes são bem conhecidas (BRIANTE et al., 2004) e a sua presença, à semelhança da oleuropeína, diminui o desenvolvimento das doenças tumorais e cardíacas, protege ainda contra a aterosclerose e previne as neuropatias diabéticas (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006). Nos estudos de Briante et al. (2004), o hidroxitirosol e a oleuropeína demonstraram influência na inibição ou atraso na taxa de crescimento de diversos agentes patogênicos presentes no trato gastrointestinal e no respiratório, nomeadamente *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginoliticus*.

Figura 3. Estrutura molecular de oleuropeína e seu metabólito hidroxitirosol

Fonte: CHAROENPRASERT; MITCHELL (2012).

Há cerca de 30 anos, diversos subprodutos da Oliveira (folhas, fruto, raízes, casca) tem sido estudado de forma a isolar a oleuropeína porque a ela são atribuídos vários benefícios à saúde humana, por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-carcinogênicas e antimicrobianas (CICERALE et al., 2009). É um glicosídeo amargo que se decompõe facilmente, através de hidrólise ácida ou enzimática, em ácido elenólico e glicose (DUARTE, 2011). Representa 73% do total dos constituintes presentes na folha de Oliveira e, embora todas as partes da árvore

tenham oleuropeína, as folhas são a maior fonte deste composto fenólico, com 60-90 mg/g de matéria seca nas folhas (PACETTA, 2007).

Por suas propriedades antioxidantes, a oleuropeína estimula a formação do óxido nítrico que é um potente agente vasodilatador, um antioxidante envolvido em processos anti-inflamatórios (BENAVENTE-GARCIA et al, 2000).

Suas propriedades anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas foram demonstradas nos estudos de Savarese et al. (2007), resultando na inibição do crescimento e da motilidade das células neoplásicas. Também atua como eficiente antibiótico (KORUKLUOGLU et al., 2010), anti-hipertensivo (SOMOVA et al., 2003), poderoso antitumoral, preventivo de doenças cardíacas em pacientes com câncer, além de ser termogênico, podendo ajudar nas disfunções metabólicas e obesidade (HAMDI; CASTELLON, 2005).

Quanto às propriedades antimicrobianas, alguns estudos já foram realizados sobre a ação antibacteriana, onde Tripoli et al. (2005) traz uma importante revisão de autores que trabalharam com os componentes fenólicos (oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol) da azeitona e do azeite para saber suas atividades bactericidas *in vitro*. Dentre eles pode-se citar a inibição de crescimento da enterotoxina B por *S. aureus* e esporos de *Bacillus cereus* (TRANTER et al., 1993); inibição completa do desenvolvimento de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *B. cereus* (AZIZ et al. 1998); eficiência antibacteriana na inibição de *S. aureus*, espécies de *Salmonella* e espécies de *Vibrio* com oleuropeína e hidroxitirosol (BISIGNANO et al. (1999); atuações contra vírus, fungos e bactérias que afetam o sistema respiratório e gastrointestinal (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000); Medina et al. (2006) estudou os vários componentes da azeitona e relatou que a oleuropeína foi a mais eficiente na inibição, destruindo a membrana das bactérias do estudo; Mendes (2012) demonstrou inibição de *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli* quando expostos à fermentação natural de azeitonas.

Além do azeite, as folhas e ramos de Oliveira apresentam propriedades antioxidantes e físico-químicas (MELLO; PINHEIRO, 2012). A folha de Oliveira é comercializada sob a forma de pó, cápsula ou xarope na suplementação humana e estudos revelam que podem diminuir a pressão sanguínea, aumentar o fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, diminuir a incidência das arritmias e prevenir espasmos musculares intestinais, reduzindo riscos de doenças crônicas por possuir biofenóis (antioxidantes) que protegem o organismo contra os radicais livres (PEREIRA et al.,

2007). A extração comercial do fruto de Oliveira gera enorme quantidade de resíduos sólidos, ou seja, as folhas e ramos quando acumuladas em grande quantidade no solo, podem impactar negativamente na sua população microbiana, além dos lençóis freáticos, por sua elevada fitotoxicidade (ROIG; CAYELA; SÁNCHEZ-MONEDERO, 2006) havendo uma importante necessidade de se utilizar essas folhas. Gonçalves (2009) incorporou folhas de Oliveira na dieta de suínos e esses animais obtiveram maior digestibilidade, reduzindo o acúmulo de gorduras e resultando numa carne magra para consumo. O chá de folhas e ramos de Oliveira são muito mais potentes em seus compostos quando comparados com o chá verde, apresentando potente ação moduladora de radicais livres, ação anticancerígena e antimicrobiana (MELLO; PINHEIRO, 2012).

Em função de todas estas descobertas das propriedades dos componentes fenólicos da Oliveira e das necessidades de estudo sobre agentes antimicrobianos, se escolheu a oleuropeína, extraída comercialmente das folhas de Oliveira, a fim de verificar se suas propriedades antimicrobianas são eficazes no combate às bactérias mais preocupantes encontradas nas indústrias de alimentos em forma de biofilme e, portanto, resistentes aos sanitizantes químicos industriais, na busca por redução a níveis seguros da população de bactérias patogênicas encontradas na indústria de alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência da oleuropeína isolada e em conjunto com agentes sanitizantes comercialmente disponíveis, para eliminação de cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* em suspensão aquosa e na forma de biofilme em superfícies de microplaca de poliestireno e aço inoxidável.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a capacidade de produção de biofilme de cepas certificadas de *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*, isoladas (biofilme monoespécie) e associadas (biofilme multiespécie), em microplacas de poliestireno e cupons de aço inoxidável;
- Verificar a atividade antimicrobiana da oleuropeína, isolada ou associada a sanitizantes químicos comerciais (ácido peracético, cloreto de benzalcônio, digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e iodofor), sobre cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* em suspensão aquosa;
- Avaliar os efeitos da oleuropeína, isolada ou associada aos sanitizantes químicos comerciais que apresentaram os melhores resultados sobre as suspensões bacterianas (ácido peracético, cloreto de benzalcônio, digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio), para remoção dos biofilmes de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* em monoespécie e multiespécie, em microplacas de poliestireno através do índice de formação de biofilmes;
- Avaliar os efeitos da oleuropeína, isolada ou associada aos sanitizantes químicos comerciais que apresentaram os melhores resultados sobre as suspensões bacterianas (ácido peracético, cloreto de benzalcônio, digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio), para inativação dos biofilmes de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* em monoespécie e multiespécie, em cupons de aço inoxidável através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O conjunto de atividades globais realizados no experimento encontra-se representado esquematicamente no fluxograma da Figura 4.

Figura 4. Fluxograma representando os diferentes métodos utilizados para avaliação da redução de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* como células em suspensão e biofilme (monoespécie e multiespécie) ao ser testados com a oleuropeína isolada ou associada aos sanitizantes comerciais, em suas análises qualitativas e quantitativas.

4.1 Isolados bacterianos

Para este estudo foram utilizados isolados de *Listeria monocytogenes* (cepa ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) e *Escherichia coli* (cepa ATCC 25922) Laborclin®, Brasil, obtidas comercialmente e mantidas sob -80°C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI - *Brain Heart Infusion*) (Merck, Alemanha) com glicerol (Synth, Brasil) a 15% (v/v) para formar uma suspensão de estoque, armazenados no laboratório de Micologia e Microbiologia da FZEA/USP, Campus de Pirassununga.

4.2 Verificação da capacidade de produção de biofilmes em microplaca de poliestireno

A verificação da capacidade de produção de biofilme foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Stepanović et al. (2003). Cada isolado foi semeado em caldo TSB (caldo tripticase soja) (Merck, Alemanha) e incubado a 37 °C / 24 h, sendo, a seguir feito o ajuste da escala 0,5 de McFarland ($\sim 10^8$ células / mL), utilizando-se TSB como branco. Uma alíquota de 200µL foi pipetada, em triplicata, nos poços de uma microplaca de 96 poços, com fundo chato (TPP, Suíça) e incubadas a 37 °C / 48 h sem agitação. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7.4, Laborclin®), secada à temperatura ambiente e corada com cristal violeta 1 % por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente. Em seguida, as bactérias coradas que aderiram na microplaca foram resolubilizadas adicionando-se 200 µL de ácido acético glacial (33 %) e foi deixado em repouso por 15 minutos. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para outra microplaca e a mesma foi colocada em um leitor de ELISA (*Labsystems, MultiSkan*, software Genesis), com leitura a 570 nm. De acordo com Stepanović et al. (2003) o controle negativo (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12.228) para o cálculo da densidade ótica (DO) foi usado com base nos cálculos para a determinação dos parâmetros para considerar um isolado produtor ou não de biofilme (DO_C). Deste modo, os isolados foram classificados de acordo com a seguinte regra:

$DO \leq DO_C$ = não produtor, $DO_C < DO \leq (2 \times DO_C)$ = fraco produtor, $(2 \times DO_C) < DO \leq (4 \times DO_C)$ = moderado produtor, $(4 \times DO_C) < DO$ = forte produtor.

4.3 Verificação da capacidade de produção de biofilmes em cupom de aço inoxidável

Para o preparo do aço inox, o protocolo de Marques (2005) foi seguido. Os cupons de aço inoxidável foram limpos com acetona 100 %, deixados por 1 hora em água destilada autoclavada com sabão neutro e enxaguados com água destilada. Em seguida, foi realizada a limpeza com álcool 70 °GL, secagem na estufa por pelo menos 15 minutos e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

Para a verificação da produção de biofilme em aço inox, o protocolo utilizado foi uma adaptação e compilação de dois protocolos: Shanks et al. (2005) e Chandra; Mukherjee; Ghannoum (2008) onde cada cepa bacteriana foi semeada em BHI e incubada a 37 °C / 24 h. Depois do tempo de incubação, uma colônia característica foi semeada em 5mL de caldo BHI, sendo, a seguir, fez-se o ajuste da escala 0,5 de McFarland ($\sim 10^8$ células / mL) utilizando-se BHI como branco, onde 2 mL do BHI incubado foi colocado dentro dos poços de uma microplaca de poliestireno de 24 poços (TPP, Suíça) contendo no fundo o cupom de aço inox ($1 \times 1 \text{ cm}^2$). As microplacas foram colocadas em estufa de 37°C/48h sem agitação.

A formação de biofilme foi analisada de acordo com Marsh; Luo (2003), empregando-se o MEV. Para estas análises, lâminas de aço inoxidável (diâmetro de 1,2 cm) foram preparadas de acordo com Marsh; Luo (2003), onde as lâminas contendo os biofilmes foram fixadas com solução de glutaraldeído a 2,5 %, enxaguadas em tampão cacodilato 0,1 M, fixadas com tetróxido de ósmio e enxaguadas. A desidratação foi realizada com etanol e água nas proporções de 25 %, 50 %, 75 % e 100 % por 10 minutos cada etapa. Após a desidratação, as amostras foram observadas ao MEV, para avaliação da formação de microcolônias e de possível estrutura tridimensional do biofilme, nos aumentos de 1000 e 5000 vezes. Os resultados foram documentados por meio da câmera acoplada ao equipamento. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12.228 foi utilizado como controle negativo, por ser reconhecidamente formador de biofilme.

4.4 Avaliação comparativa da atividade bactericida da oleuropeína com sanitizantes químicos

4.4.1 Perfil de resistência por determinação da Concentração Inibitória Mínima

A OLE utilizada no estudo foi adquirida da Sigma-Aldrich, (produto O8889 - 500 mg), a qual foi diluída em 100 mL de água + etanol (), resultando na solução de trabalho contendo 5 mg / mL. A escolha do composto comercial levou em consideração o fato de não ter sido encontrada nenhuma pesquisa anterior com a OLE isolada, mas apenas estudos apresentando as propriedades existentes na folha de Oliveira, no azeite ou na azeitona (TRIPOLI, 2005), além de trabalhos sobre a atividade antimicrobiana das folhas (MARKIN; DUEK; BERDICEVSKY, 2002) contra vários microrganismos de importância à saúde humana (KUROKLUOGLU et al, 2012).

Além da OLE, foram utilizados seis princípios ativos de sanitizantes químicos comercialmente disponíveis, para fins de comparação com a atividade bactericida da oleuropeína. As concentrações dos sanitizantes foram definidas de acordo com os critérios recomendados para uso nas indústrias de alimentos como agentes sanitizantes e, portanto, autorizadas pelo Ministério da Saúde. Os sanitizantes químicos utilizados nesse estudo foram o APA a 2 %, o CB a 1 %, o DC (composto de amônia quaternária) a 2 %, o HS a 2 %; o PH a 3% e a TI a 2 %.

O perfil de resistência a sanitizantes foi avaliado através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada bactéria a ser testada, 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 a realização do teste, foram preparados tubos de ensaio com meio de cultura BHI para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e BHI + Extrato de Levedura para *L. monocytogenes*. A seguir, os tubos foram inoculados com uma suspensão padrão do organismo (100 µL) a ser testado contra diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. O procedimento para determinação da CIM utilizou as séries de tubos de ensaio (1 a 12), como esquematizado na Figura 5. Após incubação a 37 °C / 24 horas, foi feita a comparação visual dos tubos.

A CIM, neste caso, foi definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo (NCCLS, 2003).

Figura 5. Esquema do método de diluição em caldo em série composta por doze tubos, onde do 1º tubo foi retirado 5mL de sanitizante e inserido no 2º tubo e assim sucessivamente até o tubo 11. Os controles eram os tubos 11 (C-), contendo BHI com sanitizante e o tubo 12 (C+), que continha apenas BHI com o inóculo.

Fonte: CARANDINA (2013)

Foram distribuídos 5 mL de meio de cultura BHI para cada tubo, exceto para o primeiro. Todos os tubos foram autoclavados com o meio de cultura a 121 °C por 15 minutos. Os experimentos foram realizados com sanitizante puro e com o sanitizante acrescido de oleuropeína (para cada 10 mL de sanitizante foi acrescido 5 mg de oleuropeína).

Em uma série de 12 tubos de ensaio com meio de cultura BHI foram acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos, onde no primeiro tubo foi adicionado 10 mL de sanitizante (diluição 100 %), sendo 5 mL transferidos para o segundo tubo (diluição 50 %) e assim sucessivamente até o tubo 11. O tubo de número 11 foi considerado o controle negativo (BHI+ antimicrobiano) e o tubo de número 12 o controle positivo (BHI + CEPA). Todos os tubos foram homogeneizados com agitador de tubos e, em seguida, incubados em estufa a 37 °C / 24 h, para

comparação visual. A CIM do antimicrobiano testado foi considerada como a concentração do tubo de maior diluição onde foi verificada a ausência de crescimento bacteriano (PACHECO, 2006). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A Tabela 3 demonstra as concentrações de solução de sanitizantes nos tubos e os controles.

Tabela 3. Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

TUBO	DILUIÇÃO	CONTEÚDO
1	1:1 ou 100 %	10 mL de sanitizante
2	1:2 ou 50 %	5 mL de BHI e 5 mL de sanitizante do tubo 1
3	1:4 ou 25 %	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 2
4	1:8 ou 12,5 %	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 3
5	1:16 ou 6,25 %	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 4
6	1:32 ou 3,12 %	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 5
7	1:64 ou 1,56 %	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 6
8	1:128 ou 0,78 %	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 7
9	1:256 ou 0,39 %	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 8
10	1:512 ou 0,19 %	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 9
11	-	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 10 (Controle -)
12	-	5 mL de BHI + CEPA (Controle +)

Fonte: Própria autoria.

4.4.2 Teste de Resistência através de Disco Difusão em Ágar

A resistência dos isolados de *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. aureus* à oleuropeína e aos sanitizantes comerciais foram testadas pelo método DDA, o qual foi adaptado da metodologia preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). A cultura de bactérias foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($\sim 10^8$ células / mL) e logo após foram plaqueadas empregando-se a técnica de *swab* de algodão padronizado, previamente esterilizado, para espalhamento da suspensão na placa de Petri contendo TSA (Ágar Trípico de Soja, Sigma-Aldrich).

Em seguida foram colocados discos de 6mm de papel filtro, previamente esterilizados, embebidos nos sanitizantes testados. As placas de *S. aureus* e *E. coli* foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas e as placas de *L. monocytogenes* por 48 horas. A interpretação dos resultados foi um seguimento dos padrões do NCCLS (2003), onde após o período de incubação, foram medidos com um paquímetro.

4.5 Avaliação comparativa da eficiência da oleuropeína na eliminação de biofilmes bacterianos

Os biofilmes foram produzidos experimentalmente em 2 tipos de superfícies (microplaca de poliestireno e discos de aço inoxidável), para as 3 espécies bacterianas. Todos os biofilmes produzidos experimentalmente foram submetidos ao contato com a oleuropeína e os sanitizantes comerciais. A temperatura dos ensaios foi mantida a 25 °C. Os protocolos de avaliação dos biofilmes estão descritos nos itens 4.2 e 4.3.

4.5.1 Microplaca de poliestireno

A formação de biofilmes seguiu o método de Stepanović et al. (2004) e Srey et al. (2014) onde cada isolado foi semeado em caldo BHI e incubado a 37 °C / 24 h, sendo, a seguir, feito o ajuste da escala 0,5 de McFarland ($\sim 10^8$ células / mL), utilizando-se BHI como branco.

Uma alíquota de 200 µL das bactérias foi pipetada, em triplicata, nos poços da microplaca de 96 poços (Figura 5), com fundo chato (TPP, Suíça). As cepas foram incubadas por 48 horas sem agitação, em seguida fez-se a leitura em ELISA (*Labsystems, MultiSkan*, software Genesis) em filtro 600 nm dos biofilmes na microplaca e logo após as células planctônicas das microplacas foram retiradas.

Para a fixação dos biofilmes, a placa de 96 poços foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS pH 7,4 Laborclin®). O sanitizante foi colocado em cada poço por um minuto, esvaziado e colocado o neutralizador Tiossulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) por cinco minutos e, em seguida a microplaca foi esvaziada e lavada com

PBS por três vezes para inserção do metanol por 15 minutos, onde foi novamente esvaziada e colocada para secagem em temperatura ambiente. Foram pipetados nos poços o cristal violeta 1 % e após 15 minutos lavado com água destilada e deixou-se secar em temperatura ambiente. Em seguida, as bactérias coradas que aderiram na microplaca foram resolubilizadas adicionando-se 200 µL de ácido acético glacial (33 %) e foram deixadas em repouso por 15 minutos e posteriormente a mesma foi levada novamente para leitura em ELISA, em filtro a 570 nm.

A eficácia da remoção do biofilme pelos sanitizantes foi comparada usando o Índice de Formação de Biofilme (IFB) calculado de acordo com a fórmula de Niu; Gilbert (2004):

$$IFB = \frac{(DO_{570nm} - DO_{c570nm})}{(DO_{600nm} - DO_{c600nm})}$$

Nesta fórmula, o $DO_{570\text{ nm}}$ foi obtido dos poços tratados com sanitizantes ou $DO_{c570\text{ nm}}$ (controle positivo pós tratamento com PBS). Os valores de $DO_{600\text{ nm}}$ e $DO_{c600\text{ nm}}$ foram obtidos dos poços que continham a formação de biofilmes pós 48 horas de estufa e antes do início dos tratamentos com sanitizantes.

Em todas as análises foram utilizados o BHI como controle negativo. Para o controle positivo, foram utilizadas as triplicatas em combinação de biofilmes nos poços sem o tratamento com sanitizantes, como exemplificado na Figura 6.

Figura 6. Exemplo dos procedimentos do experimento realizado na microplaca de 96 poços. Controle negativo com quatro poços e controle positivo representado nas linhas G e H com as triplicatas de cada biofilme em monoespécie e em multiespécie, sem o tratamento com sanitizante. Os tratamentos das triplicatas de biofilmes expostos aos sanitizantes estão representados nas linhas A/B, C/D e E/F.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BHI	Sg	Sg	Sg	Lm	Lm	Lm	Ec	Ec	Ec	Sg+ Lm	BHI	Sanitizante 1
B	Sg+ Lm	Sg+ Lm	Sg+ Fc	Sg+ Fc	Sg+ Ec	Lm+ Ec	Lm+ Fc	Lm+ Fc	Lm Ec Sg	Lm Ec Sg	Lm Ec Sg		
C													Sanitizante 2
D													
E													Sanitizante 3
F													
G													Controle
H	BHI											BHI	

4.5.2. Cupom de aço inoxidável

O protocolo utilizado foi uma adaptação e compilação de dois protocolos: Shanks et al. (2005) e Chandra; Mukherjee; Ghannoum (2008). Para a verificação da produção de biofilme em cupom de aço inoxidável (área 1 x 1 cm²), cada ATCC foi semeada em caldo BHI e posteriormente replaqueada para evitar qualquer contaminação nos meios de cultura específicos para cada bactéria.

Depois do tempo de incubação dos meios de cultura, uma colônia característica foi semeada em 5mL de caldo BHI e incubado a 37 °C / 24 h, sendo, a seguir, feito o ajuste da escala 0,5 de McFarland (~ 10⁸ células / mL), utilizando-se BHI como branco. Para o preparo do aço inox, o protocolo de Marques (2005) foi seguido. Cupons de aço inoxidável foram limpos com acetona 100 %, deixados por 1 hora em água destilada autoclavada com sabão neutro e enxaguados com água destilada autoclavada. Em seguida, foi realizada a limpeza com álcool 70 °GL, secagem na estufa por pelo menos 15 minutos e autoclavagem por 15 minutos a 121°C.

4.6 Avaliação qualitativa da eliminação de biofilmes em contato com sanitizantes

4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Depois de 24 h, 2 mL do BHI incubado foi colocado dentro de um poço de uma microplaca de poliestireno de 24 poços (TPP, Suíça) contendo no fundo o cupom de aço inoxidável (1 x 1 cm²). As microplacas foram colocadas em estufa a 37 °C por 48 h sem agitação. A formação de biofilme foi analisada de acordo com Marsh; Luo (2003), empregando-se a Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (TM300-HITACHI, Japão).

Após o tempo de estufa, o aço inox contendo as bactérias e suas combinações nas microplacas de 24 poços (Figura 7) foi tratado com os sanitizantes, onde foi colocado 2 mL em cada poço por 15 minutos, esvaziado e, em seguida colocou-se o neutralizador Tiosulfato de Sódio (Na₂S₂O₄) por cinco minutos e logo após, foi feita a lavagem com água *milli-Q* autoclavada e adicionado 2 mL da solução de Karnovsky por uma hora e secagem em temperatura ambiente.

A desidratação foi realizada com etanol e água nas proporções de 25 %, 50 %, 75 % e 100 % de etanol por 10 minutos a cada etapa. Após a desidratação, as amostras foram observadas ao MEV, para avaliação das microcolônias nos aumentos de 1000 e 5000 vezes. As amostras foram fixadas em um *stub* utilizando uma fita adesiva (dupla-face) condutiva de carbono. A tensão de aceleração utilizada foi de 15Kv. Os resultados foram documentados por meio da captura de imagens do computador acoplado ao microscópio. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12.228 foi utilizado como controle negativo e serviu como base para a análise das imagens, por serem reconhecidamente formadores de biofilme. Após a visualização, o material foi autoclavado e descartado.

O método de identificação e estudo de biofilmes através da microscopia é conhecido como visual. A MEV é a mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme (MACEDO, 2000) e por seu alto poder de resolução. O aço inoxidável, largamente empregado nas indústrias alimentícias, por apresentar as características de resistência a baixas temperaturas, ser uma superfície lisa, que dificulta a aderência e retenção dos microrganismos e facilidades de limpeza, se mostrou em condições laboratoriais, uma superfície favorável à formação de biofilmes e à sua

persistência após a sanitização. Para Ronner; Wong (1993), essas superfícies são as principais fontes de contaminação microbiana. Neste estudo todas as fotomicrografias resultaram em persistência dos biofilmes após a sanitização.

Figura 7. Ilustração de microplaca de 24 poços de fundo chato com o biofilme formado pelos isolados, visualizados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após coloração pelo corante cristal violeta (1%). **Legenda:** LM1 = *L. monocytogenes*; SA2 = *S. aureus*; EC3 = *E. coli*; SE4 = *S. epidermidis* (controle); LM+SA5 = *L. monocytogenes* + *S. aureus*; SA+EC6 = *S. aureus* + *E. coli*; LM+SA+EC7 = *L. monocytogenes* + *S. aureus* + *E. coli*; LM+EC8 = *L. monocytogenes* + *E. coli*.

4.6.2 Microscopia Confocal

O sistema de cultivo contendo cupons de aço inoxidável descrito no item 4.5.2 foi utilizado nesta etapa do estudo para avaliar se os biofilmes de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* após tratamento com sanitizantes eram inibidos. Para isso se usou como controle negativo os biofilmes em caldo BHI.

Os biofilmes foram semeados nos tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI e incubados em estufa a 37°C / 24 h. Depois do tempo de incubação dos meios de cultura, foram feitos os ajustes da escala 0,5 de McFarland ($\sim 10^8$ células / mL). Após a diluição, foram colocados 2 mL do BHI incubado em tubos contendo o aço inoxidável no fundo para verificação do crescimento da biomassa do biofilme em estrutura abiótica e deixado na estufa a 37 °C por 48 horas, sem agitação e tratados com BHI durante esse período para garantir suprimentos nutritivos aos biofilmes. Após as 48 horas os tubos foram esvaziados e os cupons de aço inoxidável foram tratados com sanitizantes por um minuto, em seguida adicionou-se o neutralizador Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) por cinco minutos e logo após foram lavados com PBS por três vezes para remoção das células não aderidas. Os cupons de aço inoxidável foram colocados deitados na lâmina

de 4 poços NUNC em vidro, com fundo de poliestireno (Lab-Tek™II, Chamber Slide™).

As células aderidas no cupom foram coradas em sala escura com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (Molecular Probes, EUA) por 15 minutos (JOSHI et al., 2010). O kit é composto de dois marcadores fluorescentes, Syto 9 (verde fluorescente) e iodeto de propídeo (vermelho fluorescente), que permite a visualização e diferenciação das células viáveis (membrana intacta – Syto 9) e das células não viáveis (membrana danificada – iodeto de propídeo).

As visualizações foram feitas em Microscópio Confocal a Laser (LEICA TCS-SP5 AOBS, software LAS-AF, do Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP) na objetiva de 630 x com óleo de imersão. O laser de argônio (488 nm – verde fluorescente) foi utilizado para visualizar as células coradas com Syto 9 e o laser de hélio (543 nm – vermelho fluorescente), foi utilizado para visualizar as células coradas com iodeto de propídeo. As imagens foram processadas com o software LAS AF version: 2.6.0 builds 7266 (Leica). Os biofilmes preparados com as cepas de *S. aureus* não foram analisados por microscopia confocal devido a problemas técnicos do equipamento.

4.7 Análise dos resultados

As amostras de biofilmes das cepas individuais e combinadas de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* foram realizadas em triplicata. Estas forneceram densidades óticas e foram avaliadas quanto a produção de biofilmes, sendo classificados nas categorias fraco, moderado e forte (STEPANOVIC' et al., 2003). Brevemente, esta classificação foi baseada nos valores de desvio padrão da densidade óptica dos pulstipos produtores de biofilme ($DO > DOc$) em relação ao valor do controle negativo (DOc) e seguidas do cálculo de médias com o objetivo de fornecer média aritmética.

Para os tratamentos com sanitizantes, todos foram conduzidos em triplicata e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), segundo o teste F e Teste de Tukey (BERQUÓ; SOUZA; GOTLIEB, 1981), utilizando-se o programa Microsoft Office Excel® 2010. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Verificação da capacidade de formação de biofilmes em microplaca de poliestireno

Os resultados em triplicata da capacidade de formação dos biofilmes de *E. coli* ($0,94 \pm 0,33$), *S. aureus* ($1,0 \pm 0,25$) e *L. monocytogenes* ($1,0 \pm 0,31$) e suas combinações, formados em microplaca de poliestireno foram classificados como “forte produtores de biofilmes” em todas as amostras no filtro de 570 nm (Tabela 4), quando comparadas as densidades óticas com a média dos controles negativos ($DO_{cn} = 0,10$, $2 \times = 0,29$, $4 \times = 0,40$) de acordo com Stepanović et al. (2004), seguindo a regra de cálculo: não produtor para $DO \leq DO_{cn}$, fraco produtor ($DO_{cn} < DO \leq 2 \times DO_{cn}$), moderado produtor ($2 \times DO_{cn} < DO \leq 4 \times DO_{cn}$) e forte produtor de biofilme ($4 \times DO_{cn} < DO$).

Tabela 4. Capacidade de formação de biofilme por *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e suas combinações na microplaca de 96 poços.

Bactéria	DO (média $\pm \bar{x}$)	Classificação ¹
SA	$1,0 \pm 0,25$	forte produtor de biofilme
LM	$1,0 \pm 0,31$	forte produtor de biofilme
EC	$0,94 \pm 0,33$	forte produtor de biofilme
SA+LM	$1,61 \pm 0,06$	forte produtor de biofilme
SA+EC	$1,16 \pm 0,40$	forte produtor de biofilme
LM+EC	$1,26 \pm 0,33$	forte produtor de biofilme
TODOS	$1,36 \pm 0,11$	forte produtor de biofilme

¹Classificado de acordo com Stepanović et al. (2004), pela comparação de cada densidade ótica (DO) com a média dos controles negativos ($DO_{cn} = 0,10$, $2 \times = 0,29$, $4 \times = 0,40$), como segue: $DO \leq DO_{cn}$ = não produtor, $DO_{cn} < DO \leq (2 \times DO_{cn})$ = fraco produtor, $(2 \times DO_{cn}) < DO \leq (4 \times DO_{cn})$ = moderado produtor, $(4 \times DO_{cn}) < DO$ = forte produtor de biofilme.

5.2 Verificação da capacidade de formação de biofilmes em aço inoxidável

Os resultados em triplicata dos biofilmes monoespécie e multiespécie de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, formados sobre os cupons do aço inoxidável visualizados por MEV (TM300-HITACHI), estão representados na figura 8. O crescimento de biofilmes foi visualizado em todos os poços.

As bactérias *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* foram escolhidas por serem patógenos contaminantes e estarem relacionadas a surtos de infecção alimentar. Além disso, são capazes de formar biofilmes e persistir em plantas de processamento de alimentos (RATTI et al., 2010) o que é fator preocupante para as indústrias alimentícias por serem potenciais formadores de biofilme, sendo mais resistentes e, conseqüentemente persistentes aos processos de higienização (limpeza e sanitização).

As propriedades físico-químicas das superfícies usadas na indústria de alimentos podem influenciar na adesão bacteriana, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (poliestireno e aço inoxidável) quando comparados às hidrofílicas (vidros) (DONLAN; COSTERTON, 2002). Este estudo verificou, em condições laboratoriais, a formação de biofilmes em monoespécie e em multiespécie, tanto em microplaca de poliestireno quanto em aço inoxidável, por serem superfícies muito utilizadas em indústria de alimentos. Sabe-se que nos ambientes de produção, a entrada destas bactérias em instalações de processamento de alimentos envolve não somente um risco imediato para a segurança alimentar, mas também em longo prazo e, por isso são necessárias medidas preventivas de higienização que eliminem o risco (VÁSQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2014).

Biofilmes são mais resistentes aos agentes antimicrobianos quando comparados com culturas de crescimento em suspensão. Essa resistência pode ser explicada pela impenetrabilidade dos agentes químicos antimicrobianos a camadas mais profundas do biofilme, devido à presença de um polímero hidrofílico que o reveste e à estratégia de justaposição das bactérias formando diferentes composições e estruturas (TIBA; NOGUEIRA; LEITE, 2009).

Figura 8. Análise da formação e crescimento de biofilmes em cupons de aço inoxidável, observados em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). **Legenda:** **A** = *Escherichia coli*; **B** = *Staphylococcus aureus*; **C** = *Listeria monocytogenes*; **D** = *L. monocytogenes* + *E. coli*; **E** = *L. monocytogenes* + *S. aureus*; **F** = *S. aureus* + *E. coli*; **G** = *L. monocytogenes* + *S. aureus* + *E. coli*; **H** = controle negativo (*S. epidermidis*).

5.3 Perfil de resistência à oleuropeína e agentes sanitizantes por determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da CIM, foram utilizados 10 mL de cada um dos sanitizantes químicos comerciais: APA, CB, DC, HS, PH e IO e 5 mg da solução orgânica OLE. Os valores estão amostrados na Tabela 5 para as cepas (200 µL) de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* nas concentrações de OLE isolada e em conjunto com os sanitizantes comerciais.

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sanitizantes avaliados e da oleuropeína para os isolados bacterianos em mg/mL, em série composta por doze tubos pelo método de diluição em caldo (com diluição 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, C- e C+) de acordo com protocolo da NCCLS (2003)

Solução/Sanitizantes	CIM (mg/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
OLE (5mg)	2,5	2,5	2,5
APA (20mg/10mL)	0,312	0,312	0,156
APA+OLE 20mg/10mL+5mg)	< 0,039*	< 0,039*	< 0,039*
CB (10mg/10mL)	0,156	1,25	0,625
CB+OLE (10mg/10mL+5mg)	0,039	0,039	0,078
DC (20mg/10mL)	0,312	2,5	2,5
DC+OLE (20mg/10mL+5mg)	0,078	< 0,039*	< 0,039*
HS (20mg/10mL)	2,5	0,312	1,25
HS+OLE (20mg/10mL+5mg)	0,625	0,156	0,312
PH (30mg/10mL)	0,234	0,117	0,468
PH+OLE (30mg/10mL+5mg)	0,234	< 0,058*	0,234
IO (20mg/10mL)	0,625	2,5	1,25
IO+OLE (20mg/10mL+5mg)	1,25	1,25	1,25

Legenda: oleuropeína (OLE), ácido peracético (APA), cloreto de benzalcônio (CB), digluconato de clorexidina (DC), hipoclorito de sódio (HS), peróxido de hidrogênio (PH) e iodofor (IO) isolados e em conjunto com OLE.

* Tubos não turvados (< 0,039 e < 0,058 mg/mL)

Os resultados apresentaram diferentes respostas frente à oleuropeína e aos seis sanitizantes químicos testados. Pode-se observar que OLE (5mg) não ofereceu

resistência a nenhum dos microrganismos (2,5 mg, diluição 1:2). Os efeitos inibitórios de OLE podem aumentar com o aumento da concentração utilizada (KORUKLUOGLU et al., 2010). Para a concentração de 5 mg/mL utilizada neste estudo foi feito, uma busca por estudos com oleuropeína resultou em apenas dois trabalhos encontrados, ambos descrevendo valores de CIM para bactérias em suspensão. Bisignano et al. (1999) obteve efeitos antibacterianos da OLE (faixa de concentração de 0,03 e 0,2mg/mL) contra 42 isolados bacterianos Gram-negativas e Gram-positivas, dentre eles *S. aureus* (ATCC 25923), no entanto OLE foi ineficiente contra *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (Gram negativas). No outro estudo, Korukluoglu et al. (2010) testou os efeitos da OLE (faixa de concentração de 0,5 mg / mL) contra 15 bactérias (dentre elas, *E. coli* e *S. aureus*) e verificou inibição em todas, exceto *S. aureus* e *Salmonella enteritidis*. Essas diferenças podem ser explicadas pelos diferentes tipos de cepas utilizadas para cada experimento testado e pela composição dos extratos contendo oleuropeína, posto que em ambos os estudos foram utilizados processos de extração com solventes orgânicos, o que pode modificar a polaridade do composto (Korukluoglu et al. (2010). O presente estudo foi realizado com cepas bacterianas certificadas formadoras de biofilme e com OLE purificada (Sigma-Aldrich).

Os isolados apresentaram diferentes respostas frente aos sanitizantes, sendo possível verificar que *E. coli* apresentou menor resistência para CB (0,156 mg / mL, diluição 1:128), seguido de PH (0,234 mg / mL, diluição 1:128), APA e DC (0,312 mg / mL, diluição 1:64); *S. aureus* resultou em resistência menor para PH (0,117 mg / mL, diluição 1:256), APA e HS (0,312 mg / mL, diluição 1:64) e *L. monocytogenes* obteve as menores resistências para APA (0,156 mg / mL, diluição 1:64), PH (0,468 mg / mL, diluição 1:64) e CB (0,625 mg / mL, diluição 1:16). Para ser considerado eficaz, um sanitizante usado em suspensão deve reduzir a população bacteriana em 5 log₁₀ (RIAZI; MATTHEWS, 2011), sendo então APA, CB, DC, HS e PH considerados eficazes no presente estudo. É preciso considerar particularidades ao comparar os resultados de diferentes experimentos, onde Moretro et al. (2012) reporta que a presença de matéria orgânica pode reduzir o efeito de desinfecção, podendo ser sugerido que o BHI utilizado para o crescimento das bactérias em suspensão pode causar algum efeito inibitório na efetividade dos sanitizantes. Ao se comparar os experimentos laboratoriais com a rotina de higienização das indústrias e sua dificuldade de isenção completa de perigos ou riscos, pode-se dizer que a ineficiência da limpeza (remoção de resíduos orgânicos), dificulta o processo de sanitização, tendo como consequência as intoxicações

alimentares, perdas totais de lotes produzidos e interrupção de processos de produção (VÁSQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2014).

Observou-se que quando os sanitizantes foram misturados à OLE resultaram em maior eficiência contra os isolados, com destaque para APA + OLE (< 0.039 mg / mL para todas as cepas). Para Wagner et al. (2002), APA é um sanitizante potente, sendo rapidamente ativado a baixas concentrações contra um espectro grande de microrganismos enquanto que outros sanitizantes (por exemplo PH) requer doses muito maiores que APA para o mesmo nível de desinfecção. Nascimento; Delgado; Barbaric (2010) sugerem que o APA interfira na função seletiva da membrana citoplasmática e ocorra ruptura das paredes das células Gram positivas. Assim, pode ser que é igualmente efetivo contra a membrana de lipoproteínas, facilitando sua ação contra células de microrganismos Gram negativos (CERETTA, 2008). Não há estudos anteriores sobre a associação de OLE a sanitizantes químicos, no entanto Medina et al. (2006), relatou a destruição das membranas celulares pela ação da OLE, o que pode ser importante ao se considerar a mistura de OLE aos sanitizantes e todos se mostrarem potencializados em seus efeitos antibacterianos. Zanichelli et al. (2005) estudou o H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) do ar em condições aeróbicas e anaeróbicas e demonstrou que há reação com a OLE, onde se cooperam entre si potencializando seus efeitos em condições aeróbicas e obteve melhores resultados contra *S. aureus* quando comparado à condição anaeróbica.

Os compostos contendo iodo são reconhecidos como potentes germicidas, sendo capazes de destruir uma larga variedade de microrganismos, tais como bactérias, fungos, leveduras, protozoários, vírus e até mesmo esporos. Possuem um alto poder de penetração ao reagir com o substrato proteico da célula bacteriana (MONTEIRO et al., 2001), porém sua utilização, segundo Kaul; Jewett (1981) tem a desvantagem de elevada afinidade por matéria orgânica, fazendo com que seu potencial oxidante e poder germicida sejam reduzidos. Neste estudo o iodofores foi o sanitizante que apresentou os menores efeitos no CIM (IO e IO + OLE) corroborando os achados de Kaul; Jewett (1981) e Moretto et al. (2012).

5.4 Teste do halo de inibição em Disco Difusão em Ágar

O método de DDA utilizado neste estudo objetivou verificar a atividade antimicrobiana dos sanitizantes em relação às bactérias em suspensão. Ostrosky et al. (2008) mencionaram o método de micro diluição em caldo (CIM) como sendo o mais confiável para avaliar agentes antimicrobianos, por fornecer resultados quantitativos e não ser influenciado pela velocidade de crescimento do microrganismo. Por outro lado, Othman et al. (2011) propuseram que, tanto o uso em base caldo (CIM) como em base ágar (DDA) são confiáveis na obtenção de resultados das atividades antimicrobianas.

Baseando-se na NCCLS (2003) foi feita uma adaptação (OSTROSKY et al., 2008) para avaliar se a bactéria é resistente (R), intermediária (I) ou sensível (S) ao sanitizante (Tabela 6), usando-se a placa com água *milli-Q* como controle negativo. O diâmetro do disco utilizado foi 6 mm e foram considerados resistentes as bactérias que não apresentaram halo, sensíveis intermediários as que tiveram halos de inibição $\geq$ a 7mm até 10 mm e sensíveis $>$ que 10 mm (Figura 10). Para cada 10 mL de sanitizante químico foi inserido 5 mg (0,005 g) de OLE (mesmo valor usado para o CIM).

Figura 9. Placas de Petri exibindo os halos de inibição pelo método de disco difusão em ágar.
Legenda: A) *L. monocytogenes* com Oleuropeína; B) *S. aureus* com Oleuropeína; C) *E. coli* com Oleuropeína; D) *E. coli* com Oleuropeína + Ácido Peracético.

Tabela 6. Resultados obtidos de acordo com as normas NCCLS (2003), adaptado de Ostrosky et al. (2008) do halo de inibição em disco difusão em ágar com a média das triplicatas dos sanitizantes como antimicrobianos para células em suspensão para a resistência de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. O halo da água *milli-Q* foi usado como controle negativo.

Bactéria	Solução sanitizante	Diâmetro do halo de inibição (mm) ¹	Classificação ²
Controle (-)	Água <i>milli-Q</i>	6,0 ± 0,00	Resistente
	OLE (5,0 mg/mL)	10,0 ± 1,63	Intermediário
	APA (2,0 %, v/v)	10,33 ± 0,47	Sensível
	APA (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	11,67 ± 0,47	Sensível
	CB (1,0 %, v/v)	10,67 ± 0,94	Sensível
	CB (1,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	15,67 ± 0,47	Sensível
	DC (2,0 %, v/v)	16,67 ± 0,47	Sensível
	DC (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg/mL)	16,67 ± 1,89	Sensível
	HS (2,0 %, v/v)	10,67 ± 2,06	Sensível
	HS (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	11,33 ± 0,47	Sensível
<i>S.</i>	PH (3,0 %, v/v)	13,67 ± 0,94	Sensível
	PH (3,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	14,67 ± 1,25	Sensível
	IO (2,0 %, v/v)	12,67 ± 0,94	Sensível
	IO (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	14,0 ± 0,82	Sensível
Controle (-)	Água <i>milli-Q</i>	7,3 ± 0,94	Intermediário
	OLE (5,0 mg/mL)	11,33 ± 2,36	Sensível
	APA (2,0 %, v/v)	12,00 ± 0,00	Sensível
	APA (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	9,67 ± 1,25	Intermediário
	CB (1,0 %, v/v)	10,67 ± 3,30	Sensível
	CB (1,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	15,00 ± 0,82	Sensível
	DC (2,0 %, v/v)	15,00 ± 0,82	Sensível
	DC (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg/mL)	10,33 ± 0,47	Sensível
	HS (2,0 %, v/v)	12,00 ± 1,41	Sensível
	HS (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	15,67 ± 0,47	Sensível
<i>E.</i>	PH (3,0 %, v/v)	19,00 ± 7,79	Sensível
	PH (3,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	10,67 ± 0,94	Sensível
	IO (2,0 %, v/v)	10,3 ± 1,25	Sensível
Controle (-)	Água <i>milli-Q</i>	6,0 ± 0,00	Resistente
	OLE (5,0 mg/mL)	8,67 ± 1,25	Intermediário
	APA (2,0 %, v/v)	14,00 ± 0,00	Sensível
	APA (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	9,00 ± 0,82	Intermediário
	CB (1,0 %, v/v)	10,00 ± 1,41	Intermediário
	CB (1,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	13,00 ± 2,16	Sensível
	DC (2,0 %, v/v)	16,67 ± 1,25	Sensível
	DC (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg/mL)	11,67 ± 1,25	Sensível
	HS (2,0 %, v/v)	11,00 ± 2,16	Sensível
	HS (2,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	12,33 ± 0,47	Sensível
<i>L.</i>	PH (3,0 %, v/v)	19,00 ± 0,82	Sensível
	PH (3,0 %, v/v) + OLE (5,0 mg / mL)	10,33 ± 0,47	Sensível
	IO (2,0 %, v/v)	13,3 ± 0,47	Sensível

¹Os resultados estão indicados como média ± desvio padrão de ensaios em triplicata.

²Resistência: Halos de inibição (HI) = 6 mm; Intermediário: HI = ≥ 7 to 10 mm; Sensitivo: HI > 10 mm, de acordo com NCCLS (2003).

Legenda: oleuropeína (OLE), ácido peracético (APA), cloreto de benzalcônio (CB), digluconato de clorexidina (DC), hipoclorito de sódio (HS), peróxido de hidrogênio (PH) e iodoform (IO) isolados e em conjunto com OLE.

A OLE apresentou pouca ação bactericida contra *L. monocytogenes* ($6,0 \pm 0,00$) corroborando os dados da CIM. No entanto houve uma sensibilidade intermediária contra *E. coli* ($7,3 \pm 0,94$ mm) e *S. aureus* ($10,0 \pm 1,63$ mm), o que não foi observado nas análises de CIM dessas duas bactérias. Ríos; Recio (2005) argumentam que alguns fatores, tais como meio de cultura, concentração de substâncias testadas, dispersão, emulsificação, temperatura e taxa de O₂ podem interferir nos valores do método de difusão e de diluição. Podem haver resultados diferentes entre os dois métodos devido a fatores intrínsecos aos testes, como por exemplo, a natureza hidrofóbica da maioria dos compostos fenólicos, que pode impedir a difusão uniforme destas substâncias (LAMBERT et al., 2001). O efeito antibacteriano da OLE, no método de diluição em caldo (CIM), pode ter sido reduzido pela oxidação mais rápida, enquanto que o método DDA mantém a OLE atuante por mais tempo, corroborando as afirmações de Ríos; Recio (2005). Naik et al. (2010) obtiveram efeitos antimicrobianos do óleo essencial de capim-limão contra isolados planctônicos de *E. coli* e *S. aureus* nos métodos de diluição e difusão, constatando que o terpeno (aldeído) penetrou a camada fosfolipídica membranar e alterou sua fluidez. Aldeídos possuem maior atividade antimicrobiana quando comparados aos álcoois (OLIVEIRA et al., 2011), tais como a OLE.

No que tange a avaliação dos sanitizantes químicos isolados, o perfil de resistência dos métodos DDA e CIM se assemelham quanto aos efeitos inibitórios contra os isolados. Porém ao se comparar os valores da diluição e difusão, o perfil de resistência de *L. monocytogenes* foi diferente nas técnicas de CIM (APA > PH > CB) e DDA (DC > PH > HS > IO), assim como para *S. aureus* que diferiu em DDA (DC > PH > IO) e CIM (PH > APA e HS). Já a bactéria *E. coli* obteve resultados em DDA (PH > DC > APA) semelhante a CIM (CB > PH > APA e DC). Pedrini; Margatho (2003) também obteve resultados de maior atividade *in vitro* do iodo e digluconato de clorexidina a 2% frente às mesmas cepas de *S. aureus* e *E. coli* deste estudo. Para Nascimento et al. (2007), o método CIM é o que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto que a difusão em placa de Petri se constitui em um método qualitativo, por isso, esses métodos (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis.

Os valores obtidos nos ensaios de Disco Difusão em Ágar confirmaram a potencialização dos efeitos dos sanitizantes comerciais pela adição da OLE. No entanto, a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos se atribui por sua capacidade em tornar a membrana celular permeável e com isso facilitar seu rompimento

(TAWEECHAI SUPAPONG et al., 2012). Os sanitizantes químicos também tem essa capacidade de alterar a permeabilidade da membrana celular ou destruir suas cápsulas de proteção (ANDRADE; MACÊDO, 1996) sendo, no entanto, uma característica relevante para se inferir nos resultados de maior atividade antimicrobiana dos sanitizantes misturados à oleuropeína.

5.5 Avaliação da oleuropeína e sanitizantes químicos sobre biofilmes em microplaca de poliestireno

O método do Índice de Formação de Biofilmes permite uma estimativa das células que atacam e aderem uma superfície e que permanecem após o tratamento com os sanitizantes, ou seja, permite avaliar os efeitos da remoção dos sanitizantes sobre os biofilmes (SREY et al., 2014). Os sanitizantes afetam os biofilmes de diferentes formas. Para o IFB foram selecionados os sanitizantes que obtiveram melhores resultados na CIM, sendo eles: APA, HS, DC e CB. O peróxido de hidrogênio não foi selecionado por fazer parte da oxidação do acetaldeído (SREY; JAHID; HÁ, 2013) também por ter seus valores semelhantes a APA. A Tabela 7 mostra o índice de formação de biofilmes em monoespécie de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* após tratamento com os sanitizantes APA e HS isolados e em conjunto com a oleuropeína em microplaca de poliestireno.

Tabela 7. Índice de Formação de Biofilme (IFB) em microplaca de poliestireno, das cepas individuais de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e percentuais de redução após os tratamentos com ácido peracético (APA) e hipoclorito de sódio (HS), isolados ou associados à oleuropeína (OLE).

Tratamento	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	IFB ¹	Redução ² (%)	IFB ¹	Redução ² (%)	IFB ¹	Redução ² (%)
Controle	0,55±0,09 ^a	-	0,61±0,29 ^a	-	0,57±0,08 ^a	-
OLE	0,66±0,16 ^a	1,1	0,69±0,14 ^a	5,3	0,56±0,04 ^a	1,9
APA	0,13±0,06 ^b	79,1	0,24±0,12 ^b	73,5	0,18±0,04 ^b	70,3
APA+OLE	0,10±0,01 ^b	80,9	0,13±0,15 ^b	83,7	0,20±0,08 ^b	69,1
HS	0,09±0,02 ^b	83,0	0,07±0,02 ^b	85,3	0,10±0,02 ^b	77,6
HS+OLE	0,09±0,04 ^b	80,7	0,06±0,01 ^b	85,8	0,06±0,01 ^b	89,7

¹ Resultados apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas.

² Percentuais calculados em relação ao controle.

^{a,b} Em uma mesma coluna, médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente (p<0,05).

A importância de se estudar a formação de biofilme em superfície de poliestireno é que estes são muito utilizados na indústria de alimentos, sendo de difícil esterilização e, portanto, podendo facilitar a contaminação dos alimentos. Os resultados para biofilmes em microplaca de poliestireno demonstraram que a OLE não inibiu a formação de biofilmes quando comparado ao controle para *E. coli* (redução 1,1 %), *S. aureus* (redução 5,3 %) e *L. monocytogenes* (redução 1,9 %). Verificou-se que o sanitizante HS teve maior redução para os três isolados de biofilmes em monoespécie quando comparado com APA, porém não tiveram diferenças significativas, assim como a mistura de OLE a esses sanitizantes não diferiu estatisticamente.

Biofilmes tem sua fisiologia modificada, tornando-se mais resistentes aos sanitizantes e compostos antimicrobianos, por terem suas limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, além da diminuição da taxa de crescimento dos microrganismos em biofilme e o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração na modulação da expressão gênica celular (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os sanitizantes químicos são divididos de acordo com sua atuação, podendo ser oxidantes, atuantes de superfície e iodóforos, que podem penetrar na parede celular (ANDRADE; MACÊDO, 1996). No estudo Vásquez-Sánchez et al. (2014), o APA se mostrou eficaz, seguido de HS e CB contra as células planctônicas e biofilmes de *S. aureus*. Nos estudos de Chorianopoulos et al. (2008), os sanitizantes HS frente a células de *L. monocytogenes* não foram suficientes para reduzir os biofilmes, mostrando-se resistente à ação de certos sanitizantes pelo tempo de exposição ou pela quantidade do sanitizante, que provavelmente precisaria ser aumentada. A falta de correlação entre as eficácias de sanitizantes podem indicar diferenças significativas na difusão e na reatividade em relação aos biofilmes, que também depende da composição da matriz extracelular. A atividade antimicrobiana elevada de HS e APA pode ser considerada pelo seu potencial oxidativo, por reagir sobre a membrana celular bacteriana, sobre o DNA e sobre os componentes da matriz extracelular (NASCIMENTO; DELGADO; BARBARIC, 2010).

Neste estudo, os sanitizantes químicos foram eficazes nas atividades antimicrobianas para todos os experimentos amostrados, no entanto as células planctônicas e os biofilmes persistiram após a sanitização, ressaltando a necessidade de busca por novos compostos. Sugere-se que para os biofilmes seja feito um estudo de aumento da quantidade de OLE isolada e misturada aos sanitizantes.

A Tabela 8 mostra o índice de formação de biofilmes das diferentes combinações (multiespécie) de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* em microplaca de poliestireno, após tratamento OLE e com os sanitizantes APA, HS, DC e CB isolados e em conjunto com a OLE.

Tabela 8. Índice de Formação de Biofilme (IFB) em microplaca de poliestireno, das cepas combinadas de *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (SA) e *Listeria monocytogenes* (LM), e percentuais de redução após os tratamentos com oleuropeína (OLE), ácido peracético (APA), digluconato de clorexidina (DC), cloreto de benzalcônio (CB), hipoclorito de sódio (HS), isolados ou associados à oleuropeína (OLE).

Tratamento	EC+LM		SA+EC		SA+LM		SA+LM+EC	
	IFB ¹	Redução ² (%)	IFB ¹	Redução ² (%)	IFB ¹	Redução ² (%)	IFB ¹	Redução ² (%)
Controle	0,93±0,48 ^a	-	0,86±0,39 ^a	-	1,26±0,56 ^a	-	1,04±0,39 ^a	-
OLE	0,22±0,08 ^{ab}	60,78	0,27±0,12 ^{ab}	75,26	0,58±0,24 ^a	72,56	0,16±0,01 ^b	91,49
APA	0,16±0,01 ^{bc}	67,08	0,24±0,14 ^{ab}	64,51	0,20±0,02 ^b	61,30	0,16±0,05 ^b	62,40
APA+OLE	0,14±0,03 ^{bc}	90,59	0,26±0,25 ^{abc}	66,45	0,27±0,09 ^b	76,79	0,14±0,04 ^b	87,69
HS	0,07±0,02 ^c	87,87	0,05±0,01 ^c	92,41	0,20±0,17 ^{bc}	65,88	0,08±0,03 ^b	90,22
HS+OLE	0,09±0,04 ^{bc}	88,13	0,14±0,08 ^c	67,50	0,06±0,01 ^c	95,98	0,07±0,02 ^b	91,98
CB	0,45±0,03 ^{ab}	37,12	0,34±0,15 ^{abc}	15,92	0,42±0,07 ^{ab}	78,25	0,41±0,07 ^a	66,53
CB+OLE	0,23±0,01 ^{ab}	78,93	0,22±0,02 ^b	82,42	0,29±0,06 ^b	63,50	0,36±0,10 ^b	60,13
DC	0,35±0,02 ^{ab}	81,15	0,44±0,12 ^{abc}	50,26	0,45±0,21 ^{abc}	67,89	0,34±0,13 ^b	66,24
DC+OLE	0,30±0,02 ^{ab}	60,29	0,29±0,09 ^{abc}	81,42	0,31±0,16 ^{abc}	74,13	0,27±0,05 ^b	78,58

¹ Resultados apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas.

² Percentuais calculados em relação ao controle.

^{a,b} Em uma mesma coluna, médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente (p<0,05).

Biofilmes correspondem a comunidades constituídas por células sésseis, mono ou multiespécie, aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002). Para os biofilmes em multiespécie, a OLE teve um maior efeito antimicrobiano e esse efeito mostrou-se superior na amostra da união das três espécies SA+LM+EC (redução 91,49 % $p < 0,05$). Alguns autores defendem que a maior resistência dos biofilmes ocorre em multiespécie, onde pode-se citar os estudos de Nostro et al. (2007) que resultaram na erradicação completa do biofilme na monoespécie *S. aureus* após o uso do óleo essencial de orégano, porém quando o biofilme na multiespécie de *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram avaliados sobre o efeito do óleo, sua efetividade foi moderada; Millezi (2012) também obteve redução maior para a multiespécie *E. coli* e *S. aureus* com óleo essencial de limão e citronela, corroborando os resultados obtidos neste estudo, onde as reduções com OLE apenas ocorreram em biofilmes multiespécie.

Uma possível explicação para essa maior efetividade dos antimicrobianos é que a multiespécie compete entre si (XAVIER et al., 2003) e a depleção por nutrientes é um dos fatores que pode desestimular a formação de biofilme, interpretada como sinal positivo ao destacamento de células (SAWYER; HERMANOWICZ, 1998).

Pesquisas sobre a adesão de biofilmes em superfícies demonstram que em monoespécie não apenas aderem, mas formam biofilmes em menos tempo, como demonstrado por Pompermayer; Gaylarde (2000), onde *S. aureus* e *Escherichia coli*, em condição de monocultivo e cultivo combinado, concluíram que o melhor desempenho de *S. aureus* aconteceu em culturas monoespécies. Boari et al. (2009) também demonstraram o sucesso de formação de biofilmes e aderência a superfície de aço inox por *S. aureus* em monoespécie superior a multiespécie corroborando os dados experimentais deste estudo, onde a maior resistência e persistência dos biofilmes após contato com os sanitizantes e a oleuropeína ocorreu em monoespécie.

5.6 Avaliação da oleuropeína e sanitizantes químicos sobre biofilmes em aço inoxidável, através de Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 10 está representada por algumas fotomicrografias selecionadas adquiridas em MEV (TM300-Hitachi, Japão) com os biofilmes de *E. coli* (Figuras 10-A

e 10-B), *L. monocytogenes* (Figura 10-C) e *S. aureus* (Figura 10-D) aderidos ao aço inoxidável após tratamento com os sanitizantes em aumento de 1000 e 5000 x.

Figura 10: Fotomicrografias em microscópio eletrônico de varredura (TM300-Hitachi, Japão) com biofilmes de *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* aderidos ao aço inoxidável após tratamento com os sanitizantes em aumento de 1000 e 5000 x e tensão de 15 Kv. **Legenda:** A - *E. coli* após tratamento com ácido peracético; B - *E. coli* após tratamento com hipoclorito de sódio; C - *L. monocytogenes* após tratamento com ácido peracético; D - *S. aureus* após tratamento com cloreto de benzalcônio em conjunto com a oleuropeína.

5.7 Avaliação da oleuropeína e sanitizantes químicos sobre biofilmes em aço inoxidável, através de Microscopia Confocal

As fotomicrografias foram adquiridas por Microscopia Confocal com os biofilmes em monoespécie *E. coli* (Figura 11), *S. aureus* (Figura 12) e *L. monocytogenes* (Figura 13) após contato com os sanitizantes APA, OLE e com a mistura de APA+OLE.

Os biofilmes aderidos em aço inoxidável foram colocados em placa NUNC de 4 poços para a leitura com aumento de 630 x com óleo de imersão e corados com o kit de viabilidade bacteriana LIVE DEAD. Foram utilizados cupons de controle para os três diferentes biofilmes, como observado nas Figuras 11-D, 12-D e 13-D, na cor verde (Syto 9) significando que estavam vivos. Nesta análise qualitativa, os resultados foram semelhantes para as três espécies do estudo, onde as Figuras 11-A, 12-A e 13-A foram do sanitizante APA, com pontos de coloração vermelha (iodeto de propídeo) significando morte ou destruição membrana da bactéria e pôde ser observada pouca redução destes, assim como para OLE (Figuras 11-B, 12-B e 13-B). No entanto, corroborando todos os resultados quantitativos amostrados neste estudo, a mistura de APA + OLE (Figuras 11-C, 12-C e 13-C) tiveram suas maiores reduções dos biofilmes.

Figura 11: Fotomicrografias em microscópio confocal com aumento de 630 x com óleo de imersão. Biofilmes de *E. coli* ATCC 25.922 formados em superfície de aço inoxidável por 48 horas a 37 °C. As células foram tratadas com sanitizante por 1 minuto, neutralizadas e em seguida foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD. Células viáveis foram coradas de verde fluorescente (Syto 9) e células não-viáveis foram coradas de vermelho fluorescente (iodeto de propídeo). **Legenda:** **A** - *E. coli* após tratamento com ácido peracético (APA); **B** - *E. coli* após tratamento com Oleuropeína (OLE); **C** - *E. coli* após tratamento com APA+OLE; **D** - *E. coli* sem tratamento (Controle).

Figura 12: Fotomicrografias em microscópio confocal e de fluorescência com aumento de 630 x com óleo de imersão. Biofilmes de *S. aureus* ATCC 29.213 formados em superfície de aço inoxidável por 48 horas a 37 °C. As células foram tratadas com sanitizante por 1 minuto, neutralizadas e em seguida foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD. Células viáveis foram coradas de verde fluorescente (Syto 9) e células não-viáveis foram coradas de vermelho fluorescente (iodado de propídeo). **Legenda:** **A** – *S. aureus* após tratamento com ácido peracético (APA); **B** – *S. aureus* após tratamento com Oleuropeína (OLE); **C** – *S. aureus* após tratamento com APA+OLE; **D** – *S. aureus* sem tratamento (Controle).

Fonte: Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal - USP/Ribeirão Preto (FAPESP, processo 2004/08868-0).

Figura 13: Fotomicrografias em microscópio confocal com aumento de 630 x com óleo de imersão. Biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 7644 formados em superfície de aço inoxidável por 48 horas a 37 °C. As células foram tratadas com sanitizante por 1 minuto, neutralizadas e em seguida foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD. Células viáveis foram coradas de verde fluorescente (Syto 9) e células não-viáveis foram coradas de vermelho fluorescente (iodeto de propídeo). **Legenda:** **A** – *L. monocytogenes* após tratamento com ácido peracético (APA); **B** – *L. monocytogenes* após tratamento com Oleuropeína (OLE); **C** – *L. monocytogenes* após tratamento com APA + OLE; **D** – *L. monocytogenes* sem tratamento (Controle).

Fonte: Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal - USP/Ribeirão Preto (FAPESP, processo 2004/08868-0).

A Microscopia Confocal é uma alternativa excelente para a visualização de células aderidas às superfícies e, para visualizar essa adesão bacteriana, usam-se substâncias fluorescentes que se ligam às células permitindo sua observação. O aço

inoxidável e o poliestireno possuem características hidrofóbicas (KSONTINI et al., 2013) e essa superfície pode favorecer a formação de biofilmes. Lee et al. (2014) não observou variação na formação de biofilmes de *S. aureus* sobre as superfícies de poliestireno e aço inoxidável enquanto Pagedar et al. (2010) demonstrou que os biofilmes de *S. aureus* tiveram preferência pelas superfícies de poliestireno em relação ao aço inoxidável e sugerem que a hidrofobicidade foi fator de relevância na formação desses biofilmes. Neste estudo foi observado que tanto poliestireno quanto aço inoxidável teve biofilmes aderidos a essas superfícies.

Para Silva; Martinis (2013), doses sub-letais de ácido peracético podem estimular a persistência dos microrganismos. Os resultados deste estudo confirmam que biofilmes aderidos a superfícies são de difícil remoção e que a dose de APA utilizada neste estudo (2%) reduziu, mas não removeu totalmente os biofilmes. Os bons resultados apresentados sobre APA+OLE e demais sanitizantes químicos misturados a OLE, demonstram que novas pesquisas com compostos naturais devem ser estimuladas em busca de novos produtos que reduzam os microrganismos a níveis consideráveis, garantindo a higienização e evitando as contaminações e patologias.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que:

- a) As cepas certificadas de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* utilizadas no estudo mostraram-se como fortes produtores de biofilmes em microplacas de poliestireno e em aço inoxidável.
- b) A oleuropeína possui pouca ou baixa atividade bactericida sobre as suspensões bacterianas das cepas certificadas de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, em comparação aos sanitizantes comerciais avaliados;
- c) A oleuropeína potencializou o efeito bactericida dos sanitizantes comerciais, sobretudo do ácido peracético, sobre as cepas certificadas de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*.
- d) A oleuropeína possibilitou a remoção (61-91%) de biofilmes multiespécies nas superfícies das microplacas de poliestireno, porém somente os sanitizantes comerciais apresentaram capacidade de remoção dos biofilmes bacterianos monoespécie na superfície deste material.
- e) Nenhum dos compostos avaliados foi capaz de inativar totalmente as células bacterianas nas superfícies de aço inoxidável, uma vez que células viáveis de todas as bactérias foram observadas após os tratamentos com os sanitizantes, indicando persistência dos biofilmes.
- f) A oleuropeína aumentou a eficiência do ácido peracético na inativação dos biofilmes bacterianos de *L. monocytogenes* formados nas superfícies do aço inoxidável.
- g) Os resultados indicam que a oleuropeína apresenta potencial para incrementar o efeito bactericida de sanitizantes comerciais para eliminação de biofilmes de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* em superfícies inertes.

7. RECOMENDAÇÕES

Após os resultados deste estudo, os quais indicam um efeito potencializador da oleuropeína sobre a ação de sanitizantes comerciais, recomenda-se a realização de novos estudos para:

- a) Verificar a relação da EPS com o componente OLE, para compreender como os biofilmes reagem às soluções orgânicas com ações antimicrobianas e assim chegar a uma melhor resposta à potencialização da oleuropeína quando misturada aos sanitizantes químicos;
- b) Avaliar se concentrações mais elevadas de OLE ($> 5,0$ mg/mL) apresentam maior eficiência sobre biofilmes bacterianos, isoladamente ou em conjunto com sanitizantes comerciais;
- c) Verificar os níveis de OLE extraída de diferentes cultivares do Brasil e do mundo, em diferentes estações, posto que neste estudo foi adquirida OLE comercial certificada.

Adicionalmente, os resultados do presente estudo poderão contribuir para estimular o aproveitamento de folhas e ramos da Oliveira, cujo acúmulo impacta negativamente na microbiota do solo e dos lençóis freáticos por sua elevada fitotoxicidade, trazendo uma possível solução aos cultivadores, além de obterem uma fonte de rendimentos com esses resíduos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.S. et al. Diarréia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agendes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, n.23, n. 3, p. 151-157, 2007.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 200. **Ciênc Agrotec**, Lavras, v.30, n.6, p. 1139-1145, 2006.

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

ANDRADE, N.J.; BRIDGEMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **J Food Protect**, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

ANDRADE, R.B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v.77, n.4, p. 741-750, 2010.

ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Editora Varela, 2008. 412 p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de setembro de 1988 Disponível em <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_PT-ANVISA-015_230888.pdf>, Acesso em 18 de junho de 2013, 1988.

ARAGON-ALEGRO, L.C. et al. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, n. 18, p. 630-634, 2007.

ATKINSON S. et al. *Quorum Sensing* and the Lifestyle of *Yersinia*. **Curr Issues Mol Biol** v.8, p.1-10, 2006.

AZIZ, N.H. et al. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios**, v. 93, p. 43–54, 1998.

BAKKER, H.C. et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **Int J Syst Evol Micr**, n.64, p. 1882–1889, 2014.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. *Staphylococcal enterotoxins*: a review. **Int J Food Microbiol**, v.61, p.1-10, 2000.

BALBANI, A.P.S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatrics** (São Paulo), n. 23, v. 4, p. 320-328, 2001.

BAN, G. et al. Synergistic effect of steam and lactic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. **Int J Food Microbiol**, v. 157, p. 218-223, 2012.

BARANCELLI, G.V. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese manufacturing Plants from the Northeast Region of São Paulo, Brazil. **J Food Protect**, v.74, n.5, p.816–819, 2011a.

BARANCELLI, G.V. et al. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, 2011b.

BELTRAME, C.A. et al. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product Concentration. **Food Sci Technol**, v.32, n.2, p. 228-233, 2012.

BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* leaves. **Food Chem**, v.68, p.457-462, 2000.

BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesq Agropec Trop**, Goiânia, v. 43, n. 4, 436-440, 2013.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: EPU, 1981, 350p.

BISIGNANO, G. et al. On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. **Pharm Pharmacol**, v.51, p.971-974, 1999.

BOARI, C.A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Food Sci Technol**, v. 29, n. 4, 2009.

BOTARO, B.G. **Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus* causador da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia de polimerase em tempo real**. 2012, 98f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2012.

BRASIL. 1993. Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos determinando seu emprego em todas as atividades desenvolvidas pela rede oficial do sistema coordenado pela Coordenação Geral de Laboratório Animal CGLA do Departamento de Defesa Animal - DDA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília.

BRASIL. 2009. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2009. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf. Acesso em 25agosto2015.

BRIANTE, R. et al. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β -glycosidase. **J Biotechnol**, v.111, p. 67-77, 2004.

CABEÇA, T. K. **Suscetibilidade de microrganismos relacionados com a contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente a desinfetantes**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

CAPELLETTI, R.V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 97f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas/SP. 2006.

CARANDINA, D.C.F. **Caracterização de biofilmes formados por cepas de *Listeria monocytogenes* e perfil de resistência a sanitizantes e antibióticos**. 2013. 68f. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP. 2013.

CARMO, G. M. I. et al. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **B Eletr Epidemiol**, v. 6, p. 1-7, 2005.

CARVALHO, J.D.G.; VIOTTO, W.H.; KUAYNE, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, n.2, p.262-267, 2007.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Associated with Pasteurized Milk from a Local Dairy** - Massachusetts, 2007. 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5740a1.htm>>. Acesso em: 27 ago. 2015.

CDC - CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate Outbreak of Listeriosis linked to Blue Bell creameries products (Final Update)**. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html>>. Acesso em 27 ago. 2015.

CERETTA, R.A. **Avaliação da eficiência do ácido peracético na esterilização de equipamentos odontológicos**. Dissertação [Mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 79p., 2008.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. *In vitro* growth and analysis of Candida biofilms. **Nature Protocols**, Londres, v.3, p. 1909-1924, 2008.

CHAROENPRASERT, S.; MITCHELL, A. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea Europaea* L.). **J Agric Food Chem**, v.60, p. 7081-7095, 2012.

CHORIANOPOULOS, N.G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **J App Microbiol**, v. 104, p. 1586-1596, 2008.

CICERALE, S. et al. Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics. Taylor and Francis group, Critical **Rev Food Sci Nutrit**, v. 49, p. 218-236, 2009.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z. The biofilm lifestyle. **Adv Dent Res**, v.11, n. 2, p. 192-195, 1997.

CRUZ, C.D.; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: an infectious agent scarcely known in Brazil. **Alim Nutr**, v. 19, n. 2, p. 195-206, 2008.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiol Mol Biol R**, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DE SÁ, F.R.N.; SZTAJNBOK, J.; DE ALMEIDA, J.F.L.; TROSTER, E.J.; VAZ, F.A.C. *Listeria monocytogenes* pneumonia in a cirrhotic child. **Int J Clin Pract**, v.58, n.5, p.536-538, 2004.

DIAS, M.T. et al. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. **Food Sci Technol**, v.32, n.4, p. 747-753, 2012.

DINGES, M.M; ORWIN, P.M; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev**, v.13, p.16-34, 2000.

DONG, Y.H.; ZHANG, L.H. Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. **J Microbiol**, v.43, p.101-109, 2005.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, n. 15, p. 167-193, 2002.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Rev Microb Infect**, v. 5, p. 1213-1219, 2003.

DUARTE, C.S.C. **Extracção e Encapsulamento de Compostos Bioactivos do bagaço de azeitona**. 2011. 113f. Dissertação (Mestrado). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Engenharia de Alimentos, 2011.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003, 690p.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiol Rev**, n. 55, p. 476-511, 1991.

FATEMI, P.; FRANK, J. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/Pseudomonas Biofilms by Peracid Sanitizers. **J Food Protect**, v.62, n.7, p. 761-765, 1999.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scient Vet**, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FERREIRA, I. et al. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. **Food Chem**, v. 103, p. 188-195, 2007.

FORATTINI, O.P. **Ecologia, Epidemiologia e Sociedade**. Artes Médicas: São Paulo, 2ª ed. *In*: Determinantes Biológicos, capítulo 15, p.432-469, 2004.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 424 p.

FRETZ, R. et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese ‘Quargel’, Austria and Germany 2009. **Euro Surveill.**, n.15, v.5, 2010.

GARCIA, P.M. et al. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente e amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. **Arq Bras Med Vet Zoo**, v.60, n.5, p.1241-1249, 2008.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4ª ed., Editora Manole, Barueri-SP, 2011, 1034p.

GILBERT, P.J.; FOLEY, I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. **Adv Dent Res**, v.11, p.160-167, 1997.

GUIMARÃES, Z.A. et al. Declínio e desigualdades sociais na mortalidade infantil por diarreia. **Rev Socied Bras Medic Trop**, v.34, n. 5, p. 473-478, 2001.

GONÇALVES, R.A.C. **Incorporação de folha de oliveira na dieta de suínos em crescimento. Efeito nas performances, digestibilidade, parâmetros sanguíneos e características da carne**. 2009, 53f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Área de concentração: Engenharia Zootécnica, 2009.

HAMDI, H.; CASTELLON, R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antitumor agent and cytoskeleton disruptor. **Biochem Bioph Res Co**, v.334, n.3, p.769-779, 2005.

HAYES, P. R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1993.

HALTER, E.L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **Int J Syst Evol Microbiol**, n. 63, p. 641–647, 2013.

HANCOCK, H.; FERRIÉRES, L.; KLEMM, P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. Federation of European Microbiological Societies - **FEMS Microbiol Lett**, v.267, p. 30-37, 2007.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. 2004, 71f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2004.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1999, 425p.

JADHAV, S. et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, n. 29, p. 125 - 130, 2013.

JAPÃO. 2009. Food poisoning statistics, 2009. Disponível em [http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/poisoning/dl/Food Poisoning Statistics 2009.pdf](http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/poisoning/dl/Food_Poisoning_Statistics_2009.pdf). Acesso em 25agosto2015.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J.; LUQUE, M. C. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **J Chromatog**, v.1108, p. 76-82, 2006.

JASS, J.; SURMAN, S.; WALKER, J. Medical Biofilms, Detection, Prevention and Control., v. 2. **John Wiley & Sons**, 2003.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: ARTMED, 711p, 2005.

JOSHI, S.G. et al. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. **Am J Infect Control**, v.38, p. 293-301, 2010.

KAUL, A.F.; JEWETT, J.F. Agents and techniques for disinfection of the skin. Surgery, **Ginecol Obstet Inves**, v.152, p.677-685, 1981.

KORUKLUOGLU, M. et al. Atividade antibacteriana e constituintes químicos da *Olea Europaea* L. Extratos das folhas. **J Process Alim Conserv**, v.34, n.3, p.383-396, 2010.

KSONTINI, H. et al. Dairy biofilm: An investigation of the impact on the surface chemistry of two materials: Silicone and stainless steel. **J Adhes Sci Technol**, n. 27, p.783–793, 2013.

LEE, S.H.I. et al. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **J Dairy Sci**, v.97, p.1812-1816, 2014.

LEE-HUANG, S. et al. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. **Biochem Bioph Res Co**, v.307, p.1029-1037, 2003.

LAMBERT, R.J. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J Appl Microbiol**, v.91, p. 453-462, 2001.

MACEDO, J.A.B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. **Rev Farmaco Medic**, v. 2, n. 7, p. 19-24, 2000.

MACHADO, A.D.S. **Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal**. 2006, 87f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. 2006.

MALHEIROS, P.S. et al. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. **J Food Saf**, v.29, p.302-317, 2009.

MARRIOTT, N.G. Principles of food sanitation. 4 ed. Gaithersburg: Aspen, p. 364, 1999.

MARKIN, D.; DUEK, L.; BERDICEVSKY, I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves antimikrobielle wirksamkeit von olivenblättern in vitro. **Mycoses**, v.46, p.132–136, 2002.

MARQUES, C.S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. 2005. 64p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Lavras, 2005.

MARSH, E.J.; LUO, A. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm forming abilities. **FEMS Microbiol Lett**, v.228, p.203-210, 2003.

MEAD, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerg infect Dis**, v.5, n.5, p. 607-625, 1999

MEDINA, E. et al. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. **J Agr Food Chem**, v.54, p.4954 - 4961, 2006.

MELLO, L.D.; PINHEIRO, M.F. Aspectos Físico-químicos de azeites de Oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alim Nutr**, v.23, n.4, p.537-548, 2012.

MENDES, P.A.F. **Caracterização da fração fenólica e atividade biológica de azeitonas de mesa ao natural produzidas na região de Trás-os-Montes. Escola Superior Agrária de Bragança**. 2012, 83f. Dissertação (Mestrado). Área de concentração: Qualidade e Segurança Alimentar, Bragança Paulista, 2012.

MENEZES, C.A. et al. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz J Microbiol**, n.34, v. 11, 2003.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 4 ed., Washington: APHA, cap. 35, p. 331-341, 2001.

MICOL, V. et al. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral hemorrhagic septicemia rhabdovirus (VHSV). **Antivir Res**, v. 66, p. 129-136, 2005.

MIGUEL, A.L.C.S.F. **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL**. 2007, 106f. Dissertação (Mestrado). Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Departamento de Engenharia Biológica, 2007.

MILLER, M.B.; BASSLER, B. Quorum sensing in bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v.55, p.165-199, 2001.

MILLEZI, A.F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. 113f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, MG. Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola. 2012.

MONTEIRO, C. N. et al. Controle Higiênico-Sanitário de Manipuladores de Alimento de Cozinhas Industriais do Estado do Ceará. **Hig Aliment**, vol. 15, p 90, 2001.

MORAES, M.S.V. et al. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciênc Tecnol Aliment**, v.17, n.3, p.325-29, 1997.

MORETRO, T. et al. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Res Int**, v. 45, n. 2, p. 532–544, 2012.

NAGY, B.; FEKETE, P.Z.S. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **Int J Med Microbiol**, n. 443, p. 6-7, 443, 2005.

NAIK, M. I. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. **Asian Pac J Trop Med**, p. 535-538, 2010.

NASCIMENTO, P.F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 6^a ed. (M7-A6). **Wayne**, v. 23, 2003, 81p.

NIU, C.; GILBERT, E.S. Colorimetric method for identifying plant structure. **Appl Environ Microbiol**, n. 70, p. 6951-6956, 2004.

NORMANNO, G. et al. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **Int J Food Microbiol**, n. 98, p. 73-79, 2005.

NORMANNO, G. et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **Int J Food Microbiol**, n. 115, p. 290-296, 2007.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J Med Microbiol**, v. 56, p. 519-523, 2007.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.69, n.3, p.277-84, 2010.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. 'Survey of aflatoxin M1 in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil'. **Food Addit Contam**, v.4, n.1, p. 57-60, 2011.

OLSEN, S.J. et al. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks – United States, 1993-1997. 2000. Disponível em <http://www.cdc.gov/MMWR/Preview/mmwrhtml/ss4901a1.htm>. Acesso em 25agosto2015.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacog**, São Paulo, v.18, n.2, 2008.

OTHMAN, M. et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **J Microbiol Methods**, v.84, p.161-166, 2011.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.322, p. 207-228, 2008.

PACHECO, J.W. **Guia Técnico ambiental de abates (bovino e suíno)**. São Paulo: CETESB, 98p. 2006. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>, Acesso em 26/08/2011.

PAGEDAR, A.; SINGH, J.; BATISH, V. K. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. **J Basic Microbiol**, n. 50, p. S98–S106, 2010.

PARIDA, S. K. et al. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. **Mol Microbiol**, v.28, n.1, p.81-93, Apr. 1998.

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. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; PEREIRA, J.L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciênc Tecnol Aliment**, v.21, p.171- 175, 2001.

PEREIRA, A. et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. **Molecules**, n. 12, p. 1153- 1162, 2007.

PINHEIRO, S. Formação de Biofilmes: um breve ensaio. **Intravenous**, v.VI, n.16, p. 1-2, 2006.

PICOLI, S.U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra. **Ciênc Tecnol Aliment**, Campinas, 26(1): 64-69, 2006.

PINTO, A.A.F.M. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. **Millenium**, v. 4, p. 91-100, 1996.

POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiol**, v. 17, n. 4, p. 361-365, 2000.

RANALLI, A. et al. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). **J Agr Food Chem**, v.54, p.434-440, 2006.

RATTI, R.P. et al. Elongated cells of *Listeria monocytogenes* in biofilms in the presence of sucrose and bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* A11. **Ciênc Tecnol Aliment**, Campinas, v.30, n.4, p.1011-1016, 2010.

RENIER, S.; HÉBRAUD, M.; DESVAUX, M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. **Env Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 835–850, 2011.

RIAZI, S.; MATTHEWS, K. R. Failure of foodborne pathogens to develop resistance to sanitizers following repeated exposure to common sanitizers. **Int Biodeterioration Biodegrad**, v. 65, n. 2, p. 374–378, 2011.

RIOS, J.L.; RÉCIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**, v.100, n. 2, p. 80-84, 2005.

RISSATO, D. P. et al. Detecção de *Escherichia coli* em água de lavagem de carcaças de frango pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). **SaBios: Rev Saúde Biol.**, v.7, n.3, p. 1-6, 2012.

ROIG, A.; CAYYELA, M.L.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A. An overview on olive mill wastes and their valorization methods. **Waste Management**, v.26, p.960-969, 2006.

RONNER, A.B.; WONG, A.C.L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **J Food Protect**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

ROSSI, A.C.R.; PORTO, E. A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilmes. **Microbiology, Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, p.40-41, 2009. Disponível em <<http://www.sbcc.com.br>>, Acesso em 29/08/2011.

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

RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C.; XAVIER, G.R. Quorum sensing em Sistemas Agrícolas. **Rev Biotecnol Ciênc Desenvol**, 33 ed., p.35-50, 2004.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. Listeria. **In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination on foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, p.343-356. Chap. 36, 2001.

RYU, J.; BEUCHAT, L.R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Appl Env Microbiol**, v. 71, n.1, p. 247-254, 2005.

SALUSTIANO, V.C. **Avaliação da Microbiota do ar de ambientes de processamento em uma indústria de laticínios e seu controle por agentes químicos**. 2002, 72f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2002.

SANITAIRE, I.D.V. Bulletin de veille sanitaire – juin 2012. Disponível em <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Bulletin-de-veille-sanitaire/Tours-les-numeros/Ouest/Bulletin-de-veille-sanitaire-Ouest>. Acesso em 25agosto2015. n.7, 2012.

SANTOS, A.L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v.43, n.6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, S.S. **Investigação da presença e da formação de Biofilmes por Estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 2009, 76f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.

SAVARESE, M.; MARCO, E.; SACCHI, R. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* L. cv. *Pisciottana*) by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chem**, n.105, p.761-770, 2007.

SAWYER, L.K.; HERMANOWICZ, S.W. Detachment of biofilm bacteria due to variations in nutrient supply. **Water Sci Technol**, v.37, n.4, p. 211-214, 1998.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Rev Bras Gin Obstetr**, v.25, n.7, p.501-505, 2003.

SCHEUSNER, D.L. Methods to evaluate cleaners and sanitizers. **J Food Protec**, v.13, n.45, p.1257-1260, 1982.

SENGER, A.E.V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas, RS, Brasil. **Rev Ciênc Amb**, Canoas, v.5, n.2, p. 25-42, 2011.

SHANKS, R.M.Q. et al. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. **Infect Immunity**, Washington, v.73, p. 4596-4606, 2005.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends Food Sci Technol**, v. 20, n. 9, p. 407–413, 2009.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157: H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Cienc Tecnol Aliment**, Campinas, v.23, n.2, p. 167-173, 2003.

SILVA, W. P. et al. *Listeria* spp. no processamento de linguiça fresca em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciênc Rural**, v.34, n.3, p. 911-916, 2004.

SILVA, M.T.N. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev Bras Pl Med**, Botucatu, v.11, n.3, p.257-262, 2009

SILVA, E.P.; MARTINIS, E.C.P. Current Knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 957-968, 2013.

SOMOVA, L. et al. Anti-hipertensivos, a atividade antioxidante e antiaterosclerótico dos triterpenóides isolados das folhas da oliveira *Olea Europaea* L. **J Ethnopharmacol**, Editora Elsevier, v.84, n.2, p.299-305, 2003.

SPREER, E. **Lactología industrial. Leche; Preparación y elaboración; Máquinas; Instalaciones y aparatos; Productos lácteos**. Zaragoza (España). ACRIBIA., 617p., 1991.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, v.31, n. 2, p. 572-585, 2013.

SREY, S. et al. Evaluation of the removal and destruction effect of a chlorine and thiamine dilaurylsulfate combined treatment on *L. monocytogenes* biofilm. **Foodborne Pathog Dis**, v.11, n. 8, p. 658-663, 2014.

SREBERNICH, S. M. Using chlorine dioxide and peracetic acid as substitutes for sodium hypochlorite in the sanitization of minimally processed green seasoning. **Ciênc Tecnol Aliment**, Campinas, n.27, v.4, p. 744-750, 2007.

STEPANOVIC, S. et al. Influence of the incubation temperatura, atmosphere and dynamics conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiol**, Londres, v.20, p. 339-343, 2003.

STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. **Lett Appl Microbiol**, v.38, p.428-432, 2004.

SUTHERLAND, I.W. et al. The interaction of phage and biofilms. **FEMS Microbiol Lett**, v.11.412, p.1-6, 2004.

TAWEECHASUPAPONG, S. et al. Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate. **South African J Botany**, n. 78, p. 37 - 43, 2012.

TERADA, A. et al. The effect of surface charge property on *Escherichia coli* initial adhesion and subsequent biofilm formation. **Biotechnol Bioengineer**, v. 109, n. 7, p. 1745 - 1754, 2012.

TESSEMA, G.T. et al. Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin sakacin P. **Appl Environ Microbiol**, n. 75, p. 6973–6980, 2009.

TIBA, M.R.; NOGUEIRA, G.P.; LEITE, D.S. Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli* strains isolated from patients with cystitis. **Rev Soc Bras Med Tropical**, v.42, n.1, p.58-62, 2009.

TOYOSHIMA, M.T.K. APANAVICIUS, A.; SOEIRO, A.M.A.; ALMEIDA, G.M.D. de, ARAI, M.H. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirhotic patients: first description in Brazil. **Rev Inst Med Tropical**, v.48, n.5, p.291-293, 2006.

TRANter, H.S.; TASSOU, S.C.; NUCHAS, G.J. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. **J Appl Bacteriol**, n.74, p.253–259, 2003.

TRIPOLI, E. et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. **Nutrition Res Rev**, v.18, p.98-112, 2005.

VALLE, J. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Appl Environ Microbiol**, v.56, p.1323-1326, 1990.

VAN HOUDT, R.; MICHELS, C. W. Role of bacterial cell surfaces structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Res Microbiol**, v. 156, p. 626–633, 2005.

VÁSQUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, v.39, p. 8-16, 2014.

VISIOLI, F.; BELLOMO, G.; GALLI, C. Propriedades anti-radicaais livres dos Polifenóis do Azeite de oliva. **Bioquim Biofis Co Res**, v.247, n.1, p.60-64, 1998.

WAGNER et al. Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: Development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent. **Water Environ. Res**, 74:33-50, 2002

WELKER, C.A.D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **R. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATILLA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **J Food Protect**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

XAVIER, J.B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Bull Biotech**, v. 76, p. 2-13, 2003.

YANG, H.; DIEZ-GONZALEZ, F.; FEIRTAG, J. Sanitizing effectiveness of commercial “active water” technologies on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 232-238, 2013.

ZANICHELLI, D. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by oleuropein is mediated by Hydrogen Peroxide. **J Food Protect**, v. 68, n. 7, p. 1492-1496, 2005.

ZHANG, S.; IANDALO, J.J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiol Lett**, v.168, p. 227-233, 1998.