



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## ACÇÃO DO ÁCIDO PERACÉTICO EM BIOFILMES FORMADOS POR *Salmonella* sp. EM SUPERFÍCIES DE POLIPROPILENO

G.R. Fonseca<sup>1</sup>, A.M. Schneider<sup>2</sup>, S. A. Costa<sup>3</sup>, M. J. Sereno<sup>4</sup>, K. Pegoraro<sup>5</sup>, L.S. Bersot<sup>6</sup>

1- Departamento de Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina –CEP: 85950-000 – Palotina – PR – Brasil, Telefone: +55(45)9931-4576 – e-mail: ([giovanarfonseca@gmail.com](mailto:giovanarfonseca@gmail.com))

2- Departamento de Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina –CEP: 85950-000 – Palotina – PR – Brasil, Telefone: +55 (45) 9999-4914 – e-mail: ([andressamaisa@ufpr.br](mailto:andressamaisa@ufpr.br))

3 - Departamento de Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina –CEP: 85950-000 – Palotina – PR – Brasil, Telefone: +55 (45) 9927-3407 – e-mail: ([sarah.almeida@ufpr.br](mailto:sarah.almeida@ufpr.br))

4- Departamento de Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina –CEP: 85950-000 – Palotina – PR – Brasil, Telefone: +55 (44) 3211-8507 – e-mail: ([mallusereno@gmail.com](mailto:mallusereno@gmail.com))

5- Departamento de Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina – CEP: 85950-000 – Palotina – PR – Brasil, Telefone: +55 (44) 3211-8507 – e-mail: ([kadigiapegoraro@gmail.com](mailto:kadigiapegoraro@gmail.com))

6- Departamento de Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina –CEP: 85950-000 – Palotina – PR – Brasil, Telefone: +55 (44) 3211-8516 – e-mail: ([lucianobersot@gmail.com](mailto:lucianobersot@gmail.com))

**RESUMO** – Neste estudo foi avaliada a eficácia do ácido peracético (AP) sobre biofilmes formados em superfície de polipropileno por três cepas de *Salmonella* sp. com diferentes capacidades de formação de biofilme (fortemente, moderadamente e fracamente formadora). As cepas utilizadas foram previamente isoladas de plantas processadoras de aves e estimuladas à produção de biofilme em cupons de polipropileno de 1cm<sup>2</sup> após incubação em 36°C/96h em caldo Luria-Bertani. Posteriormente, os cupons foram colocados em imersão em concentrações de 0,1%, 0,7% e 1,5% de AP em tempos de ação diferentes (5, 10 e 15 minutos). A combinação de 0,1% de AP no tempo de 5 minutos se mostrou menos eficiente e a concentração de 1,5% de AP a mais eficiente. Concluiu-se que na concentração de 0,7% a partir dos 5 minutos de ação já demonstrou resultados satisfatórios, já a menor concentração sugerida pelo fabricante (0,1%), não se mostrou efetiva na redução de biofilme.

**ABSTRACT** – This study evaluated the efficacy of peracetic acid (AP) on biofilms formed on the polypropylene surface by three strains of *Salmonella* sp. with different capacities to form biofilm (strong, moderate and weak adherent). The strains used were previously isolated from poultry processing plants and stimulated the production of biofilm in 1cm<sup>2</sup> polypropylene coupons after incubation on 36°C/96h using Luria-Bertani broth. Subsequently, the coupons were immersed in concentrations of 0,1%, 0,7% and 1,5% of AP and different times of action (5, 10 and 15 minutes). The combination of 0,1% of AP in 5 minutes time showed less efficacy and the concentration of 1,5% of AP was more efficient. It was concluded that the concentration of 0,7% action has shown satisfactory results, however, the lowest concentration suggested by manufacturer (0,1%), was not effective in reducing biofilm.

**PALAVRAS-CHAVE:** Frango; abatedouro; sanitizante.

**KEYWORDS:** Poultry; slaughterhouse; sanitizer.



## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o consumo de carne de frango vem crescendo significativamente ao redor do mundo devido seu baixo custo e alto benefício nutricional, sendo o Brasil o terceiro maior produtor, ficando atrás dos EUA e da China, e o maior exportador mundial (ABPA, 2015). Com esse crescimento na produção e comercialização, aumentou a necessidade de ter um controle mais rígido sobre normas e regras para assegurar o padrão de qualidade.

Durante o processamento, as carcaças de frango podem ser contaminadas por micro-organismos patogênicos provenientes de diversas fontes como da matéria fecal, conteúdo estomacal e da própria pele (Capita et al., 2004) sendo *Salmonella* sp. considerada como um dos patógenos mais importantes envolvidos em contaminações de alimentos à base de frango (Rissato et al., 2011).

*Salmonella* spp. é uma enterobactéria que compõe a microbiota intestinal de animais, com grande capacidade de adaptação intestinal em frangos de corte. Uma vez encontrada nas carcaças, naturalmente, podem se disseminar para o ambiente e se aderir às superfícies, devido os micro-organismos deste gênero possuem capacidade de se agregar em metal, vidro, plástico e outras superfícies através da formação de biofilmes (Stepanovic et al., 2004; Ziech et al., 2016).

Os biofilmes são compostos por micro-organismos aderidos a superfícies e envoltos em uma matriz polimérica hidratada. Essa matriz é sintetizada pelo próprio grupo de micro-organismos e é composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos que juntos são denominados “exopolissacarídeos” (EPS) (Sauer et al., 2007). A formação do biofilme começa com a aderência de moléculas orgânicas ou inorgânicas em superfícies, decorrente de falhas na higienização, formando um filme condicionante. A fase reversível se inicia com a adesão por força de Van der Waals e atração eletrostática das células planctônicas com o substrato pré-formado e a fase irreversível é resultado da produção dos EPS, fortalecendo as ligações entre as bactérias e a superfície (Oliveira et al., 2010).

Após formado, o biofilme pode se tornar uma constante forma de contaminação para alimentos e utensílios que façam qualquer tipo de contato com o mesmo (Joseph et al., 2001). Os micro-organismos formam estes compostos como estratégia para otimizar sua sobrevivência (Kasnowski et al., 2010), uma vez que os desinfetantes se tornam menos efetivos frente as bactérias aderidas nas superfícies, diferentemente de células planctônicas (Møretro et al., 2012). Além da sua grande importância na adesão e contaminação de equipamentos e alimentos, existe uma grande dificuldade encontrada em sua eliminação, conferindo risco à saúde do consumidor e prejuízos à indústria (Flach et al., 2005).

Para diminuir a contaminação de carcaças e riscos de transmissão de doenças à população, a indústria emprega vários tipos de ações de limpeza e sanitização do seu sistema de produção. Alguns sanitizantes são capazes de despolimerizar as substâncias poliméricas extracelulares (Chavant et al., 2004), como o ácido peracético, um forte oxidante que atua na parede celular e no interior da célula microbiana danificando o seu sistema enzimático levando a destruição do micro-organismo (Nascimento et al., 2010). Amplamente utilizado na indústria, este sanitizante é seguramente decomposto pelo ambiente, além da sua eficácia não ser afetada por resíduos de matéria orgânica (Srey et al., 2013). As concentrações de ácido peracético usualmente utilizadas pela indústria na higienização de superfícies e equipamentos podem variar, de acordo com o estabelecido pelo fabricante do produto, entre 0,1% e 1,5% (Peracid®).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ácido peracético em concentrações comercialmente utilizadas e em tempos de ação distintos na remoção de biofilme formado em superfície de polipropileno por cepas de *Salmonella* spp. previamente isoladas de plantas processadoras de aves.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS



A partir de um estudo prévio realizado por Ziech et al. (2016), foram selecionadas três cepas de *Salmonella* sp. isoladas de plantas processadoras de aves classificadas de acordo com sua capacidade de formação de biofilme segundo a metodologia de Stepanovic (2000), fortemente, moderadamente e fracamente formadoras de biofilmes. As três cepas previamente selecionadas foram purificadas em ágar Xilose Lisina Deoxicolato (Difco™) e testadas frente a três diferentes concentrações e três tempos diferentes de ação do ácido peracético.

Para a formação de biofilmes, foram utilizados cupons de 1 cm<sup>2</sup> de polipropileno, lavados e esterilizados, embebidos em frascos com 50 ml de caldo Luria-Bertani (LB) (Difco™) inoculados com *Salmonella* sp. a uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL (0,5 na escala de MacFarland) de cada cepa selecionada. Posteriormente, os frascos foram mantidos por 96h a 37°C sob agitação de 100 rpm em Orbital Shaker (BIOSAN®).

Após a realização do protocolo para formação de biofilme, os cupons foram retirados do caldo LB, lavados com 10 ml de Solução Salina Tamponada (PBS) para remoção das células planctônicas e, em duplicata, foram adicionados nas diferentes concentrações de ácido peracético (Peracid®), 0,1%, 0,7% e 1,5%, e mantidos em contato por 5, 10 e 15 minutos. Também foi feito um controle positivo em duplicata para cada cepa testada, onde os cupons não passaram pelo processo de sanitização, apenas lavagem com PBS.

Para a remoção e contagem das células que permaneceram viáveis nos cupons, mesmo após o tratamento com o sanitizante, foram friccionados *swabs* na superfície do cupom (área de 1cm<sup>2</sup>), os quais foram homogeneizados em 2ml de solução salina durante 10 segundos em *vortex*, e semeado *pourplate* em Ágar Triptona Soja (Difco™) (visto que as cepas foram previamente purificadas em ágar seletivo-diferencial) e incubados a 35°C/24h. Foi realizado uma repetição do teste e os resultados foram expressos em log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das quantificações de cada cepa testada recuperadas dos cupons de polipropileno após tratamento com ácido peracético estão na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos (log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>) de cada cepa de *Salmonella* sp. testada frente a diferentes concentrações de ácido peracético e tempos de contato.

Cepa testada*	Concentração do AP**	Tempo de contato com o AP (minutos)			Controle positivo***
		5	10	15	
Fracamente	0,1%	1,63	0,78	1,96	3,4
	0,7%	ND****	1,93	0,30	
	1,5%	ND	ND	ND	
Moderadamente	0,1%	0,84	ND	ND	4,4
	0,7%	0,70	0,48	ND	
	1,5%	0,30	ND	ND	
Fortemente	0,1%	0,48	0,30	ND	3,7
	0,7%	ND	0,70	0,69	
	1,5%	ND	ND	ND	

\*Cepas fraca, moderada e forte: dados obtidos a partir da classificação segundo Stepanovic (2000)



\*\*AP: ácido peracético

\*\*\*Controle positivo: média da contagem de dois cupons sem contato com o AP

\*\*\*\*ND: não detectado

Dados preliminares deste estudo foram avaliados somente sob o aspecto descritivo e não estatístico. Novas repetições serão realizadas com o objetivo de reduzir possíveis valores ou informações duvidosas, permitindo-se avaliar os dados estatisticamente.

Para aproximar o estudo realizado *in vitro* das condições reais, foram utilizadas cepas isoladas de plantas processadoras de aves no lugar de cepas de referência e também o polipropileno, material usado nas esteiras do local onde foram isoladas as colônias, e avaliadas quando a ação de um sanitizante de uso comum nas indústrias de alimentos dentro das concentrações indicadas pelo fabricante.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 1), a concentração de 1,5% de ácido peracético aparentemente mostrou eficiência na redução de todo o biofilme formado cujas reduções logarítmicas foram superiores a 3,4; 4,4 e 3,7 para as cepas fraca, moderada e forte, respectivamente. Apesar da cepa moderadamente formadora de biofilme, sob efeito do sanitizante nesta concentração durante 5 minutos não ter demonstrado eliminação total das células, o sanitizante se mostrou eficiente na taxa de redução de *Salmonella*, visto que Mørseth et al. (2009) concluíram que para certificar a eficácia de um sanitizante frente às células aderidas, é necessário que ocorra uma redução de mais de 4 ciclos logarítmicos, resultado encontrado nessa situação. A concentração do sanitizante de 0,1% em 5 minutos mostrou-se menos eficiente para todas as cepas quando comparada com os demais tratamentos. Apesar de 0,1% do ácido peracético ter indicação de uso como sanitizante nas indústrias, os resultados corroboram com a necessidade de se respeitar o tempo de ação mínima indicada que é de 10 minutos (Peracid®).

Ziech et al. (2016) constataram uma redução de 1,87 log de *Salmonella* aderidas em cupons de polipropileno pela ação do ácido peracético a uma concentração de 0,2% do sanitizante. Neste estudo, as reduções mais próximas ao trabalho citado foram vistas principalmente quando utilizada a concentração de 0,1% na cepa fraca, mostrando que a utilização de uma baixa concentração do sanitizante como sugere a concentração mínima do fabricante (Peracid®) não é tão segura na eliminação do patógeno.

Silva et al. (2010) encontraram resultados superiores quando comparados com os dados obtidos, onde ao avaliar a redução das contagens de micro-organismos aderidos em granito e aço inoxidável, demonstraram uma redução de 5,58 log UFC/cm<sup>2</sup>, sendo ácido peracético, na concentração de 0,006%, o sanitizante que apresentou melhor eficiência quando comparado com hipoclorito de sódio (0,01%) e amônia quaternária (0,02%), 5,32 log UFC/cm<sup>2</sup> e 4,33 log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente. Essa grande redução logarítmica, mesmo em baixas concentrações, pode ser atribuída pelo baixo tempo de incubação (12 horas) que acaba diminuindo a aderência de células no material e devido ao uso de outras superfícies de contato.

Avaliando o comportamento de biofilme formado por *Staphylococcus aureus* em superfícies de polipropileno, Souza et al. (2014) encontraram reduções variando de 2,6 a 3,7 log UFC/cm<sup>2</sup> no tratamento com ácido peracético na concentração de 0,003%, resultados semelhantes com algumas situações deste estudo. Quando comparados os resultados obtidos com a ação do hipoclorito de sódio (0,025%), que teve redução variando entre 1,9 e 2,4 log UFC/cm<sup>2</sup>, no mesmo trabalho, ficou evidente a maior eficácia pela ação do ácido peracético.

## 4. CONCLUSÃO

A eficiência do ácido peracético na redução de biofilme formado por *Salmonella* sp. depende da concentração e o tempo de ação utilizada. As concentrações mais baixas recomendadas pelo



fabricante (0,1%) aparentemente não mostraram eficiência na redução logarítmica no tempo de contato de 5 minutos, entretanto o fabricante indica um tempo de contato não inferior a 10 minutos.

Com concentrações superiores a 0,7% a partir de 5 minutos de ação, o sanitizante já demonstrou eficácia, sendo seguro para utilização na indústria.

Para complementar essa pesquisa, será necessário realizar novas repetições com o objetivo de sanar possíveis resultados duvidosos e analisá-los estatisticamente.

## 5. AGRADECIMENTOS

G. R. Fonseca, S. A. Costa, L. S. Bersot recebem apoio do CNPq; A. M. Schneider recebe apoio da Fundação Araucária/PR; M. J. Sereno recebe apoio da CAPES e K. Pegoraro recebe apoio do MEC.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Proteína Animal. (2015). *Relatório Anual 2015*. São Paulo. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>.

Chavant, P., Gaillard-Martinie, B. & Hébraud, M. (2014). Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 241–248.

Flach, J., Karnopp, C. & Coração, G. (2005). Biofilm formation from milk in contact with raw material: virulence factors involved. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(3), 291-296.

Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar & I., Karunasagar I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 367–372.

Kasnowski, M. C., Matilla, S. P. S., Oliveira, L. A. T. & Franco, R. B. (2010). Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 8(15).

Møretro, T., Heir, E., Nesse, L. L., Vestby, L. K. & Langsrud, S. (2012). Control of Salmonella in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International*, 48(2), 532 – 544.

Nascimento, H. M., Delgado, D. A. & Barbaric, I. F. (2010). Avaliação Da Aplicação De Agentes Sanitizantes Como Controladores Do Crescimento Microbiano Na Indústria Alimentícia. *Revista Ceciliana*, 2(1), 11–13.

Oliveira, M. M., Brugnera, D. F. & Piccoli, R. H. (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69(3), 277-284.

Rissato, D. P., Borgo, A. P., Moreira, J. P., Baptista, F., Conti, A. C. M. & Ribeiro, A. B. (2011). Detecção de *Salmonella* spp. em água de lavagem de carcaças de frango utilizando o método de reação em cadeia da polimerase. *Revista Saúde e Pesquisa*, 4(1), 35-39.

Sauer, K., Rickard, A. H. & Davies, D. G. (2007). Biofilms and biocomplexity. *American Society for Microbiology*, 2(7), 347-353.

Srey, S., Jajid, I. K. & HA, S. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.

Silva, I. D., Careli, R. T., Lima, J. C. & Andrade, N. J. (2010). Effectiveness of cleaning and sanitizing procedures in controlling the adherence of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis, and



*Staphylococcus aureus* to domestic kitchen surfaces. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 231-236.

Souza, E. L., Meira, Q. G. S., Barbosa, I. M., Athayde, A. J. A. A., Conceição, M. L. & Júnior, J. P. S. (2014). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 67-75.

Stepanovic, S., Cirkovic L., Rannin L. & Svabic-Vlahovic M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Institute of Microbiology and Immunology*, 38, 428-432.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.

Ziech, R. E., Perin, A. P., Lampugnani, C., Sereno, M. J., Viana, C., Soares, V. M., Pereira, J. G., Pinto, J. P. A. & Bersot, L. S. (2016). Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 85-90.