

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Nutrição**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**Efeito da formação de biofilme por *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala sobre a sensibilidade a sanitizantes**

**Anelise Bravo Friedriczewski**

**Pelotas, 2017**

**Anelise Bravo Friedriczewski**

**Efeito da formação de biofilme por *Staphylococcus coagulase positiva*  
isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala sobre a  
sensibilidade a sanitizantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Dias Timm

Co-orientador: Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra

Pelotas, 2017

Anelise Bravo Friedriczewski

Efeito da formação de biofilme por *Staphylococcus coagulase positiva*  
isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala sobre a sensibilidade a  
sanitizantes

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Pelotas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra

Prof. Dr. Fernando da Silva Bandeira

Prof <sup>a</sup>. Dr <sup>a</sup>. Rita de Cássia dos Santos da Conceição

## **Resumo**

FRIEDRICZEWSKI, Anelise Bravo de. **Efeito da formação de biofilme por *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala sobre a sensibilidade a sanitizantes.** 2017. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2017.

A mussarela de leite de búfala, principal tipo de queijo obtido a partir desse leite no Brasil, é um produto novo no mercado, com alta aceitação pelos consumidores e excelentes perspectivas de comércio. O queijo é um alimento rico em nutrientes, o que favorece a proliferação de micro-organismos que podem provocar toxo-infecções ou intoxicações nos consumidores. A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* coagulase positiva. Um problema que pode dificultar a eliminação de micro-organismos indesejáveis na indústria de alimentos é a formação de biofilme. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da formação de biofilme por *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) isolados de queijo mussarela de búfala sobre a sensibilidade a sanitizantes. A partir de contagens de SCP realizadas em 50 amostras de queijo mussarela de búfala foram obtidos isolados, que foram comparados entre si por rep-PCR e identificados bioquimicamente e por multiplex PCR. As cepas distintas foram testadas quanto a formação de biofilme em placas de microtitulação. As cepas forte formadoras e uma não formadora de biofilme foram testadas em superfícies de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro. Também foram testadas quanto à sensibilidade ao hipoclorito de sódio e ao iodo após a formação do biofilme. Vinte amostras de queijo albergavam SCP, entretanto as contagens estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. A rep-PCR mostrou que cada uma das amostras que estavam contaminadas apresentava uma única cepa, as quais foram identificadas como *S. aureus*. Dois isolados foram classificados como forte formadores de biofilme, sete como moderados formadores, dez fracos formadores e um como não formador de biofilme. As duas cepas forte formadoras produziram biofilme nas três superfícies testadas. A aplicação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo promoveu uma redução das populações bacterianas de aproximadamente 2 log em todas as superfícies, tanto das cepas formadoras de biofilme como da não formadora. Embora as cepas formadoras de biofilme não sejam mais resistentes aos sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo do que as não formadoras, elas atingem maiores concentrações no biofilme, o que resulta em maiores populações bacterianas remanescentes após a aplicação dos sanitizantes.

**Palavras chave:** Adesão bacteriana; patógeno alimentar; sanitizantes.

## **Abstract**

FRIEDRICZEWSKI, Anelise Bravo de. **Effect of biofilm formation by coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mozzarella cheese elaborated with buffalo milk on sensitivity to sanitizers.** 2017. Thesis (Master in Nutrition and Food.) Postgraduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas 2017.

The Buffalo milk mozzarella cheese, main type of chesse obtained from this milk in Brazil, is a new product in the market, with high consumer acceptance and excellent prospects for trade. The cheese is rich in nutrients, which favors the proliferation of microorganisms that can cause food toxi-infections in the consumer. The staphylococcal gastro-enteritis is caused by ingestion of food containing enterotoxins produced by coagulase-positive *Staphylococcus*. One problem that may hinder the elimination of undesirable microorganisms in the food industry is the formation of biofilms. The objective of this study was to determine the effect of biofilm formation by coagulase-positive (CPS) *Staphylococcus* isolated from buffalo mozzarella cheese on sensitivity to sanitizers. From CPS counts carried out on 50 samples of buffalo mozzarella cheese were obtained isolates, which were compared by rep-PCR and biochemically identified and by multiplex PCR. The distinct strains were tested for biofilm formation in microtiter plates. Strong forming and non-biofilm forming strains were tested on high density polyethylene, stainless steel and glass surfaces. They were also tested for sensitivity to sodium hypochlorite and iodine after biofilm formation. Twenty samples of cheese harbor CPS, however the counts were within the limits established by Brazilian legislation. Rep-PCR showed that each of the samples that were contaminated had a single strain, which was identified as *S. aureus*. Two isolates were classified as strong biofilm formers, seven as moderate formers, ten weak formers and one as non-biofilm builder. The two strong forming strains produced biofilm on the three surfaces tested. The application of sodium hypochlorite and iodine sanitizers promoted a reduction of approximately 2 log bacterial populations on all surfaces of both the biofilm and non-forming strains. Although biofilm forming strains are no longer resistant to sanitizers sodium hypochlorite and iodine than non-forming sanitizers, they reach higher concentrations in the biofilm, resulting in larger bacterial populations remaining after application of the sanitizers.

**Key words:** Bacterial adhesion; Foodborne pathogen; Sanitizers.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Cepas formadoras de biofilme (131 e 97) e não formadora (101) em diferentes superfícies.....	27
---	----

## **LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS**

Aap	Proteína
AGR	Regulador Gene Acessório
AI	Autoindutoras
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EE	Enterotoxinas
EPS	Substância Polimérica Extracelular
G-SASG	Proteína de Superfície
LPSN	List of Promaryotic Names With Standing in Nomeclature
PAI	Peptídeo Autoindutor
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNAG	N- acetil glicosamina extracelular
QS	<i>Quorum Sensing</i>
Rep-PCR	Diferenciação genética
SCP	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 Contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva formadores de biofilme (cepas 131 e 97) e não formador (cepa 101) em superfície de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro após a ação de sanitizantes.....29

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	10
2 Revisão de literatura.....	13
2.1 <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	13
2.2 Biofilme.....	14
2.3 Formação do biofilme.....	15
2.4 Regulação do biofilme.....	17
2.5 Processo de higienização na indústria de alimentos.....	18
3 Material e métodos.....	21
3.1 Coleta de amostras.....	21
3.2 Contagens de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	21
3.3 Identificação das espécies de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	21
3.4 Obtenção e manutenção dos isolados.....	22
3.5 Extração de DNA.....	22
3.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	22
3.7 Reação em cadeia da polimerase de elementos repetidos (rep-PCR).....	23
3.8 Verificação da formação de biofilme em placas.....	23
3.9 Verificação da formação de biofilme em diferentes superfícies.....	24
3.10 Sensibilidade a sanitizantes das cepas em biofilme.....	25
3.11 Análise estatística.....	25
4 Resultados e discussão.....	26
5 Considerações finais.....	31
6 Referência bibliográficas.....	32

## 1 Introdução

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016), queijo é o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite, coagulado pela ação física do coalho, de enzimas específicas ou de ácidos orgânicos, todos de qualidade apta para uso alimentar. A mussarela de leite de búfala (*Bubalus bubalis*), principal tipo de queijo obtido a partir desse leite no Brasil, é um produto novo no mercado, com alta aceitação pelos consumidores e excelentes perspectivas de comércio (ABCB, 2016). O leite de búfala apresenta inúmeras propriedades biológicas, destacando-se a concentração de ácido linoléico (FERNANDES, 2005). Outra característica do leite de búfala é possuir alto teor de proteínas coloidais, cálcio e fósforo (ANDRADE *et al.*, 2009). As porcentagens elevadas de proteínas (3,9 a 4,5%) e de gordura (6,9 a 8,6%) em relação ao leite de outras espécies (TONHATI *et al.*, 2000) permitem que seu uso seja uma alternativa economicamente mais favorável para a produção de queijos (ABCB, 2016).

O processo de fabricação da mussarela de leite de búfala envolve a obtenção da coalhada, a sua acidificação, a fusão em água quente, o esticamento até a obtenção de uma massa macia e homogênea (filagem), o corte, a moldagem dessa massa, o endurecimento e a salga em salmoura fria (TEIXEIRA, 2005).

O queijo é um alimento rico em nutrientes, o que favorece a proliferação de micro-organismos que podem levar a alterações nas características sensoriais do produto e/ou provocar toxi-infecções alimentares nos consumidores (KOELLN, 2009).

A incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) constitui um dos problemas de saúde pública mais frequentes do mundo contemporâneo. São causadas por agentes etiológicos, principalmente bactérias, os quais ingressam no organismo humano através da ingestão de alimentos contaminados (WELKER *et al.*, 2010).

Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2002), para garantir a inocuidade dos alimentos são estabelecidas instruções de rotina que estão ligadas a produção, armazenamento e transporte. Entre os critérios, é exigida atenção especial para a etapa de higienização das instalações, equipamentos e utensílios, além do controle da higiene e saúde dos manipuladores. Dentre as DTA,

destaca-se a intoxicação estafilocócica que é ocasionada por *Staphylococcus* produtores de toxinas (CUNHA, 2007).

A gastrenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham enterotoxinas, as quais são produzidas somente por algumas espécies de *Staphylococcus* (JAY, 2005). *S. aureus* é considerada a espécie mais importante do gênero em função da sua alta patogenicidade ao homem e devido à sua frequente associação às doenças estafilocócicas veiculadas por alimentos (CUNHA, 2007). Além de *S. aureus*, também *S. hyicus* e *S. intermedius* têm sido associados a surtos de intoxicação de origem alimentar, sendo estas três espécies as de maior interesse em microbiologia de alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2003). Estes micro-organismos também são capazes de produzir a enzima coagulase, característica que confere maior grau de patogenicidade (BRASIL, 2003).

As falhas no processamento, aliadas a elevadas temperaturas de conservação dos alimentos no comércio varejista, são fatores que contribuem significativamente para a comercialização de produtos com qualidade microbiológica imprópria para o consumo humano. A presença de altas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em um alimento significa, em geral, que as práticas de limpeza e desinfecção e/ou o controle de temperatura não foram adequados em algum ponto (FORSYTHE, 2013). Pele, boca e fossas nasais dos manipuladores dos alimentos, matérias-primas, utensílios e equipamentos podem ser fontes de contaminação (FLEMING *et al.*, 2010). Segundo Guimarães *et al.* (2012), outro aspecto importante a se relacionar aos casos de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva é a presença da inflamação da glândula mamária, que afeta tanto bovinos quanto bubalinos.

ANVISA (BRASIL, 2001) normatiza os padrões microbiológicos para diversos alimentos. Para os queijos de média umidade, dentre os quais está incluída a mussarela, o valor máximo permitido para *Staphylococcus* coagulase positiva é  $10^3$  UFC/g.

*Staphylococcus* coagulase positiva são frequentemente encontrados em amostras de diferentes tipos de queijos, em especial em mussarela. Castro *et al.*, (2012), ao investigar a qualidade microbiológica do queijo tipo mussarela comercializado na Bahia, verificou que, de doze amostras analisadas, 11 (91,66%) apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de  $10^3$  UFC/g. Esse estudo constatou que este resultado está diretamente ligado às condições as

quais o produto final é submetido após a fabricação, em especial durante sua distribuição e comercialização. Em outro estudo realizado por Duarte *et al.*, (2011), em Minas Gerais, de quatro marcas de queijo mussarela analisadas, uma (25%) apresentou contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Esses autores concluíram que a presença desses patógenos no alimento deve-se principalmente à qualidade da matéria-prima e às condições higiênicas do laticínio.

Outro problema que pode dificultar a eliminação de micro-organismos indesejáveis na indústria de alimentos é a formação de biofilmes, estruturas constituídas por células aderentes a uma superfície, embebidas numa matriz de exopolissacarídeo. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (KASNOWSKI, 2010; OLIVEIRA, 2010).

A formação de biofilme conduz a sérios problemas de higiene e perdas econômicas, devido à contaminação de alimentos e danos em equipamentos, podendo se desenvolver nas mais variadas superfícies (SALIMENA, 2014). Segundo Milan *et al.* (2015), os biofilmes têm a capacidade de promover uma barreira física, no interior da qual as bactérias ficam menos expostas à ação dos sanitizantes, permanecendo em maior número sobre as superfícies após a limpeza e sanitização das mesmas. De acordo com Rossi (2016), a resistência intensificada das células no interior dos biofilmes é atribuída à neutralização de sanitizantes pela matriz polimérica, já que a mesma é constituída por matéria orgânica e pela exposição das células a concentrações subletais de sanitizantes no interior do biofilme.

Para que as recomendações de qualidade microbiológica exigidas para o queijo mussarela de búfala sejam alcançadas, mantendo as contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva dentro de limites aceitáveis, é necessária a adoção de efetivos programas de sanidade animal, limpeza e sanitização, os quais somente poderão ser elaborados de forma eficiente conhecendo as características dos micro-organismos, como a capacidade de formar biofilme e os efeitos desta atividade sobre a sensibilidade a sanitizantes.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 *Staphylococcus coagulase positiva (SCP)*

O gênero *Staphylococcus* é constituído de bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, imóveis, não esporuladas, não capsuladas ou com limitada capacidade de formação de cápsula. Apresentam-se, microscopicamente, sob o agrupamento de “cachos de uva”, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm. Podem ser encontrados isolados, aos pares ou em pequenas cadeias, dependendo da idade da colônia (KOMATSU *et al.*, 2010).

São micro-organismos produtores das enzimas catalase, coagulase, termonuclease e hemolisinas. A maioria das espécies é anaeróbica facultativa com genoma de aproximadamente 2.000 a 3.000 kb (KLUYTMANS, 2010; REYES, 2010).

*Staphylococcus* possuem versatilidade nutricional e apresentam capacidade de sobreviver e se multiplicar em diferentes condições ambientais por longo período de tempo (JORDA *et al.*, 2012).

É uma bactéria mesófila que têm temperatura de multiplicação entre 7 e 47,8°C e podem produzir enterotoxinas termorresistentes que não são inativadas nas temperaturas de 72°C a 75°C utilizadas no processo de pasteurização. O pH ideal para seu desenvolvimento varia entre 6,0 e 7,0 mas podem se multiplicar em alimentos com pH variando entre 4,0 e 9,8. Estes micro-organismos têm ainda a capacidade de sobreviver e se multiplicar em concentrações com até 15% de cloreto de sódio (JAY, 2005).

Atualmente, o gênero é composto de 52 espécies e 28 subespécies pertencentes à família *Staphylococcaceae* (LPSN, 2017). A maioria não produz a enzima coagulase. A exclusividade da síntese caracteriza as espécies coagulase positiva: *S. aureus*, *S. schleiferis*, sp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini*. Algumas dessas espécies são frequentemente associadas a diferentes infecções de caráter oportunista, tanto em humanos como em animais (CHAVES, 2012).

No homem, podem surgir desde infecções benignas na pele (foliculite, impetigo e furúnculo) até doenças sistêmicas capazes de levar à morte (NAGASE *et al.*, 2002). Além do mais, quando as enterotoxinas (EE) são produzidas no alimento

e ingeridas pelo homem, causam sintomas diversos como: dor de cabeça, náusea, vômitos, cólicas, abdominal e prostração (GAUTIR, 2003).

Normalmente a presença de *Staphylococcus* spp. é detectada em grande parte dos alimentos de origem animal, manipulados e sem tratamento térmico adequado. As espécies de maior importância em alimentos são *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, sendo que o *S. aureus* é o mais comumente envolvido em surtos de intoxicação alimentar, devido à produção de EE. Pode ser transmitido aos alimentos através da matéria-prima, do ambiente de processamento, ou durante o preparo, manipulação, transporte, armazenamento e distribuição, favorecendo a multiplicação microbiana com consequente produção de enterotoxina (GAUTIR, 2003; REYES, 2010).

O *S. aureus*, possui importante papel como patógeno humano já que dispõe de um conjunto amplo de mecanismos de virulência (RATTI, 2009). Trata-se de um micro-organismo com capacidade de sobreviver e multiplicar em diferentes variedades de ambientes por um longo período de tempo, tornando sua presença na natureza amplamente distribuída (KLUYTMANS, 2010).

O ser humano constitui um reservatório natural de *S. aureus*, que pode ser encontrado em diversas partes do corpo humano, como o trato respiratório, principalmente nas cavidades nasais, consideradas nichos ecológicos naturais de *S. aureus*, na pele, no trato intestinal e na boca (FERREIRA et al., 2010; KLUYTMANS, 2010).

Outros animais também podem apresentar-se como portadores ou contaminados pela bactéria, como por exemplo, os bubalinos, que podem desenvolver mastite estafilocócica e produzir leite contaminado. Além disso, a contaminação ambiental durante ordenha ou processamento do leite, torna este produto um dos principais alimentos veiculadores desta bactéria, e consequentemente, seus derivados, como os queijos (FERREIRA et al., 2010; KLUYTMANS, 2010; SERIDAN et al., 2012).

## 2.2 Biofilme

Entre os mecanismos de virulência do *Staphylococcus*, destaca-se a formação de biofilme sendo que o biofilme representa uma fonte persistente de patógenos. O controle dos biofilmes resulta em um desafio crítico, pois, muitas

vezes, as superfícies e equipamentos de indústrias fornecem um ambiente favorável para sua formação. Segundo alguns autores (OTTO, 2013; GIAOURIS *et al.*, 2014; ABDALLAH *et al.*, 2014), os micro-organismos presentes em um biofilme são distintos fenotipicamente de seus homólogos de vida livre, apresentando, geralmente, maior tolerância a sanitizantes.

Biofilmes são definidos como uma comunidade complexa e estruturada de micro-organismos envoltos por uma matriz extracelular, aderidos entre si a uma superfície biótica e/ou abiótica. A habilidade dos micro-organismos em aderir a superfícies fornece uma vantagem evolucionária que permite a maturação, aumento da taxa de sobrevivência e o estabelecimento de relações simbióticas por meio do microambiente do biofilme. Além do mais, o modo de vida em comunidade provê resistência contra condições ambientais hostis, como privação de nutrientes, temperatura e pH extremos, excesso de salinidade, entre outros (LAVERTY *et al.*, 2013; OTTO, 2013; GIAOURIS *et al.*, 2014).

A espessura de um biofilme pode variar de uma simples camada de células, até múltiplas camadas envoltas por um meio polimérico viscoso (ARCHER *et al.*, 2011). Os micro-organismos em um biofilme apresentam diferentes níveis metabólicos e de expressão gênica ao longo de suas camadas e estabelecem uma série de processos de comunicação celular (TRENTIN *et al.*, 2013).

### **2.3 Formação do biofilme**

Um biofilme é constituído tipicamente pelas células microbianas e pela matriz ou substância polimérica extracelular (EPS). A matriz, por sua vez, é composta basicamente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, e corresponde a aproximadamente 50 a 90% da matéria orgânica do biofilme. As substâncias poliméricas produzidas pelos micro-organismos servem para manter as células sésseis unidas, bem como propiciam um ambiente de troca de material genético e formam a estrutura tridimensional do biofilme (ABDALLAH *et al.*, 2014; GIAOURIS *et al.*, 2014).

A formação do biofilme é um processo dinâmico que envolve as etapas, adesão inicial reversível, adesão irreversível com início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme, maturação e dispersão (ABDALLAH *et al.*, 2014).

A adesão inicial pode ocorrer em superfícies bióticas, como tecido humano, ou abióticas como superfícies metálicas, plásticas ou de vidro encontradas na indústria de alimentos. Nesta etapa, a adesão é mediada por fatores inespecíficos, como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, e específicos, como moléculas de superfícies. O depósito de material orgânico proveniente de alimentos, também favorece a formação de um filme condicionante que facilita a adesão microbiana (DUFOUR *et al.*, 2012; OTTO, 2013). Em acréscimo, a presença de apêndices nos micro-organismos, como fímbrias e flagelos, também promove maior aderência (ABDALLAH *et al.*, 2014).

A superfície é um fator que desempenha um importante papel na adesão bacteriana. De forma geral, qualquer superfície é vulnerável à adesão por micro-organismos, incluindo plástico, vidro, metal, e produtos alimentícios. Algumas propriedades físico-químicas da superfície, como textura, carga, pH, temperatura, composição nutricional e hidrofobicidade, influenciam na adesão (SREY *et al.*, 2013; GIAOURIS *et al.*, 2014).

Após a adesão inicial, as células começam a se replicar formando microcolônias. Então, a adesão reversível torna-se irreversível principalmente por causa da secreção de EPS, que forma a matriz do biofilme (ABDALLAH *et al.*, 2014). Posteriormente à ligação irreversível, torna-se bastante complexa a remoção do biofilme, uma vez que os micro-organismos se fixam fortemente à superfície e ligações químicas muito fortes são estabelecidas (SREY *et al.*, 2013).

Na terceira etapa de formação do biofilme ocorre a maturação, que é caracterizada pela presença de macrocolônias circundadas por canais de água, que auxiliam a distribuir nutrientes e moléculas sinalizadoras (DUFOUR *et al.*, 2012). Nesta fase são produzidas as adesinas, que intervêm no contato célula-célula, resultando na proliferação dos micro-organismos em agrupamentos e na produção das multicamadas do biofilme (PERIASAMY *et al.*, 2012). Em *Staphylococcus*, uma das mais importantes moléculas de adesão é a adesina intercelular polissacarídica (PIA), também designada N-acetyl glicosamina polimérica (PNAG), em decorrência de sua composição química. A PIA é sintetizada, exportada e modificada pelos produtos do operon *icaADBC*, com quatro regiões codificantes. Outras moléculas adesivas de adesão também participam do processo, como a proteína associada à acumulação (Aap), proteína G de superfície (G-SasG), proteína A, e ácidos teicóicos, entre outros (OTTO, 2013).

A dispersão constitui a última etapa e permite que as células individualmente ou aglomeradas revertam-se para a forma de vida planctônica. Esta mudança geralmente ocorre quando a disponibilidade de nutrientes é limitada ou simplesmente para propagar-se e colonizar outros nichos (DUFOUR *et al.*, 2012; SREY *et al.*, 2013). Por meio da dispersão, micro-organismos podem contaminar outras superfícies e repetir o ciclo de formação do biofilme. Este processo é resultado de diversas condições ambientais, que promovem a expressão de genes envolvidos na dispersão (ABDALLAH *et al.*, 2014). Em *Staphylococcus* spp., a dispersão é realizada primordialmente por pequenos peptídeos anfipáticos denominados modulinas solúveis em fenol (PSM) e por outras proteases extracelulares. Estas substâncias desfazem a estrutura do biofilme pela degradação de proteínas, como adesinas e exopolímeros, componentes estruturais essenciais do biofilme (PERIASAMY *et al.*, 2012; LAVERTY *et al.*, 2013; OTTO, 2013).

## 2.4 Regulação do biofilme

Importantes mecanismos de sobrevivência bacteriana, tais como simbiose, formação de biofilme, produção de substâncias antibióticas e de virulência, são controlados por sistemas regulatórios, que adaptam a expressão de genes de virulência conforme alterações nas condições ambientais. Em *Staphylococcus* já foi demonstrado, por exemplo, a presença dos sistemas *agr* (regulador gene acessório). Estes sistemas são reconhecidos como *quorum sensing* (QS), isto é, um mecanismo de comunicação célula-célula. O QS confere à bactéria capacidade de reconhecer a densidade populacional pela mensuração da acumulação de pequenas moléculas sinalizadoras específicas, denominadas autoindutoras (AI). Somente quando a densidade populacional é alta, a acumulação do sinal no meio extracelular é suficiente para ativar a resposta transcracional (KONG *et al.*, 2006; LAVERTY *et al.*, 2013; SOLANO *et al.*, 2014). O locus *agr* é composto por dois operons divergentes expressos pelos promotores P2 e P3. O operon P2 contém os genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. A ação combinada dos produtos dos genes *agrD* e *agrB* é responsável pela síntese do peptídeo autoindutor (PAI). O *agrD* codifica a sequência do PAI, e *agrB*, uma endopeptidase transmembrana, que atua no processamento em excreção do PAI. Quando o peptídeo autoindutor atinge uma concentração linear em uma determinada densidade celular, há a ligação deste com uma histidina-quinase

transmembrana, codificada pelo gene *agrC*. A proteína *agrC* ativa, por sua vez, a resposta da proteína reguladora *agrA*, codificada pelo gene *agrA*, que se liga a dois promotores, ativando a transcrição do operon *agr* em um processo de retroalimentação, e do RNAIII, o impulsor intracelular do sistema. Em adição, o *agrA* pode ativar diretamente a expressão de operons que codificam as PSM (BEENKEN *et al.*, 2010; OTTO, 2013).

O sistema *agr* está intrinsecamente relacionado com biofilmes, principalmente durante a fase de dispersão das células microbianas. Estudos reportam que *Staphylococcus* que utilizam o sistema *agr* na forma de vida séssil possuem camadas de biofilme mais finas do que mutantes *agr*-negativos, devido à habilidade de se destacar do biofilme maduro. A dispersão ocorre pela ativação das PSM, como a δ-toxina, codificada pelo RNAIII e mediada pelo sistema regulatório *agr*. Alguns produtos da regulação pelo sistema QS, como proteases e DNases, também participam da dispersão microbiana (LAVERTY *et al.*, 2013). Existem dados da literatura que demonstram que a repressão do sistema *agr* é necessária para adesão e desenvolvimento do biofilme (BEENKEN *et al.*, 2010).

Diversas condições ambientais influenciam na formação do biofilme, tais como concentração de nutrientes, oxigênio, osmolaridade, temperatura e pH. Estresses ambientais podem mediar a expressão do gene regulatório acessório estafilocócico (*sarA*), que estimulam a formação do biofilme por meio da regulação positiva sobre a produção de proteínas e polissacarídeos que formam o EPS (ARCIOLA *et al.*, 2012).

## 2.5 Processo de higienização na indústria de alimentos

A aplicação de procedimentos de limpeza e desinfecção é uma estratégia comum utilizada para controlar a instalação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em equipamentos industriais (NASCIMENTO *et al.*, 2010). No entanto, tais procedimentos podem não ser totalmente eficazes sobre estruturas de biofilmes e, assim, induzir a seleção de micro-organismos resistentes (SIMÕES *et al.*, 2010).

Diferentes produtos químicos podem ser utilizados na limpeza de utensílios e equipamentos nas indústrias, incluindo produtos tensoativos ou alcalinos, usados para suspender os restos de alimentos pela diminuição da tensão superficial, ou emulsão de gorduras e desnaturação de proteínas (MARTINS, 2011).

A eficácia dos sanitizantes pode ser limitada pela presença de material orgânico, incluindo gorduras, carboidratos e proteínas. Além disso, pH, temperatura, dureza da água, inibidores químicos, concentração e tempo de contato também são fatores importantes que influenciam a ação dos sanitizantes.

Dentre os produtos utilizados na indústria de alimentos para sanitização, se destacam os compostos à base de cloro e o iodóforo (MACHADO *et al.*, 2010). A ação oxidante e sanificante dos derivados clorados é controlada pelo ácido hipocloroso, um produto resultante da hidrólise da substância clorada. O ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) é um ácido fraco que em solução aquosa se dissocia para formar o íon hidrogênio e o íon hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ). Tanto  $\text{HClO}$  como o  $\text{ClO}^-$  têm ação antibacteriana, porém o primeiro atua de forma mais eficiente (MACHADO, 2010). O ácido hipocloroso é rapidamente consumido na interação com a matéria orgânica, formando subprodutos de desinfecção. O produto clorado mais utilizado atualmente é o hipoclorito de sódio, devido à sua alta disponibilidade e baixo custo (MENEGARO *et al.*, 2016).

Os componentes iodados, como iodo/iodeto de potássio (5,0%), iodo/iodeto de potássio/etanol (83%), iodo/álcool etílico (2,0%) e iodóforo (0,5 a 1,75%), são mais comumente utilizados como sanitizantes de equipamentos e utensílios na indústria. Algumas restrições com relação ao uso do iodo como sanitizante são a excessiva pressão de vapor, problemas de solubilidade, irritação da pele, olhos e mucosas dos manipuladores. O desenvolvimento de iodóforos tornou o uso do iodo como agente de sanitização mais viável. O termo iodóforo significa carregador de iodo. Esses compostos liberam lentamente o iodo e apresentam uma melhor solubilidade, são inodoros, não irritam a pele, quando comparados a soluções aquosas e alcoólicas de iodo (CAMPOS *et al.*, 2016).

A ação bactericida dos compostos iodados deve-se, principalmente, ao  $\text{I}_2$  liberado pelas soluções aquosas e pelos complexos com agentes tensoativos. O iodo é eficiente sobre células bacterianas, sejam Gram-positivas ou negativas. Pressupõe-se que o  $\text{I}_2$  penetra na parede celular ocasionando a destruição de estrutura protéica e inibindo o sistema enzimático por meio da oxidação do aminoácido tirosina, formando diidotirosina, o que alteraria a estrutura da enzima, assim como sua atividade (LOPES *et al.*, 2013).

Considerando a hipótese de que SCP isolados de queijos produzidos com leite de búfala são capazes de formar biofilme em diferentes superfícies,

aumentando a sua resistência a sanitizantes, o presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito da formação de biofilme por SCP isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala sobre a sensibilidade a sanitizantes. Os objetivos específicos foram investigar a contaminação por SCP de queijo mussarela elaborado com leite de búfala comercializado no Rio Grande do Sul, identificar as espécies de SCP isoladas, verificar a capacidade dos isolados formarem biofilme, verificar a capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies e verificar a sensibilidade a sanitizantes dos isolados imersos em biofilme.

### **3 Material e métodos**

#### **3.1 Coleta de amostras**

Foram analisadas 50 amostras de marcas distintas de queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala, produzidas por indústrias sob inspeção federal adquiridos no comércio varejista das cidades de Pelotas e Porto Alegre, RS. As amostras foram mantidas em suas embalagens originais de venda, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas ao laboratório para realização das análises.

#### **3.2 Contagens de *Staphylococcus coagulase positiva***

As amostras foram analisadas através de contagens de *Staphylococcus coagulase positiva*, conforme os Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003). Diluições seriadas das amostras foram semeadas em duplicata em ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C por 48 h. Cinco colônias típicas e cinco atípicas de cada placa foram inoculadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Himedia) e incubadas a 37°C por 24 h para realização da prova da coagulase, que consistiu na mistura de 0,3 mL de cada cultura com 0,3 mL de plasma de coelho e incubação a 37°C por 6 h para observação de coagulação. Foi calculada a proporção de colônias coagulase positivas em relação à contagem de colônias típicas e atípicas na placa e o resultado final da contagem de cada placa foi obtido pela soma do número de colônias coagulase positivas. Após, foi calculada a média das duplicatas e realizada a correção da diluição utilizada para a contagem.

#### **3.3 Identificação das espécies de *Staphylococcus coagulase positiva***

Para identificação das espécies, as cepas que apresentaram reação positiva para produção de coagulase foram submetidas à caracterização bioquímica, conforme GANDRA *et al.* (2005), e confirmação pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Como controle, foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

### **3.4 Obtenção e manutenção dos isolados**

Até três colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva por amostra foram inoculadas em BHI e incubadas a 37°C por 24 h. As culturas foram misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -70°C. Os isolados foram recuperados em BHI a 37°C por 24 h, quando necessário.

### **3.5 Extração de DNA**

O DNA dos isolados foi extraído conforme Sambrook e Russel (2001). Resumidamente, o *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em BHI, foi ressuspensionado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foi adicionado 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Para completar a lise celular dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, adicionou-se 100 µL de solução de lisostafina (100 µg/mL de lisostafina em tampão de acetato 20 mM) após obtenção do *pellet* obtido pela centrifugação de cultura em BHI e incubou-se a 37°C por 1 h. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5M a -70°C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%, seguido de eluição em 40 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

### **3.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Após as provas bioquímicas, a confirmação das espécies foi feita por multiplex PCR desenvolvido por Gandra *et al.* (2016) para identificação de *S. aureus*, *S. intermedium* e *S. hyicus*, através da pesquisa da presença do gene *nuc*, com pequenas modificações. Cada reação de 50 µL continha 2 µL do DNA extraído, 25 µL de Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 1 µL (10 pmol) de cada primer e 17 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação consistiu de 2 min a 94°C, 2 min a 55°C e 3 min a 72°C por 40 ciclos. Os produtos da PCR foram corados com GelRed™ (Unicience, São Paulo, Brasil) e analisados por

eletroforese em gel de agarose a 1% (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha) utilizando L-PIX 112 EX (Loccus biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil).

### **3.7 Reação em cadeia da polimerase de elementos repetitivos (rep-PCR)**

Os isolados foram analisados pela rep-PCR, utilizando o *primer* (GTG)<sub>5</sub>, o qual, segundo Braem *et al.* (2011) e Mohapatra *et al.* (2007), apresenta elevado poder de discriminação para *Staphylococcus* spp. A técnica foi realizada de acordo com Versalovic *et al.* (1994), com modificações. Resumidamente, as condições da rep-PCR foram as seguintes: 2 µL de DNA, 2 µL do oligonucleotídeo 5'-GTGGTGGTGGTGGT-3', 12,5 µL de Master Mix (Quiagem, Alemanha) e 8 µL de água para completar o volume da reação. Os ciclos da amplificação foram efetuados da seguinte forma: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos subsequentes de 95°C por 30s, 45°C por 1min e 60°C por 5 min, e finalmente 1 ciclo de 60°C por 16 min. Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões amplificadas, os produtos da PCR foram corados com GelRed e a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 2%.

### **3.8 Verificação da formação de biofilme em placas**

Os isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), seguindo a técnica descrita por Janssens *et al.* (2008), com modificações, de forma a adaptar o método para *Staphylococcus* spp. Foram colocados 100 µL de caldo Trypticase de Soja (TSB, *Tryptic Soy Broth*, Himedia) em cada poço da placa de microtitulação e adicionados 100 µL de culturas *overnight* em TSB de cada cepa padronizada em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de caldo TSB, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. Então, a tampa foi colocada sobre a placa e incubada durante 48 h a 37°C sem agitação. Durante a incubação, os biofilmes formaram-se sobre a superfície das cavidades, nas tampas. Para quantificação da formação de biofilmes, as tampas foram lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O material que permaneceu ligado à tampa foi corado durante 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200 µL) e a tampa foi

secada em temperatura ambiente por 30 min. O corante que permaneceu ligado ao biofilme foi extraído com ácido acético glacial 30% (200 µL). A DO<sub>570</sub> de cada poço foi medida utilizando leitor de placas de microtitulação. Cada cepa foi classificada como não formadora de biofilme, fracamente formadora, moderadamente formadora ou fortemente formadora, de acordo com os critérios sugeridos por Stepanovic *et al.* (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles e a classificação foi determinada conforme segue.

DO ≤ DOc = não formadora

DOc < DO ≤ 2 x DOc = fraca formadora

2 x DOc < DO ≤ 4 x DOc = moderada formadora

4 x DOc < DO = forte formadora

### **3.9 Verificação da formação de biofilme em diferentes superfícies**

Os isolados considerados formadores de biofilme nas placas de microtitulação foram testados quanto à capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies, conforme técnica utilizada por Milan *et al.* (2015), com modificações. Foram utilizadas placas de superfícies planas com 4 cm<sup>2</sup> de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro estéreis. Todas as diferentes superfícies foram colocadas dentro de um Becker contendo 200 mL de TSB e 4 mL de cultura *overnight* de cada isolados separadamente. A cada 48 horas de incubação, as placas foram lavadas suavemente duas vezes com PBS 3% NaCl para remoção de células não aderidas e novamente inseridas em Becker com 200 mL de TSB, porém sem o inóculo. Após cinco repetições do procedimento, foram passadas zaragatoas estéreis sobre toda a superfície de cada placa e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina 0,85%. A partir desta, foram feitas diluições seriadas para contagem dos micro-organismos em ágar Baird-Parker. Uma cepa não formadora de biofilme foi utilizada como controle negativo. Para considerar se houve formação de biofilme ou não, foi considerado o valor de 10<sup>7</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, estabelecido por Andrade, Bridgeman e Zottola (1998).

### **3.10 Sensibilidade a sanitizantes das cepas em biofilme**

A eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio (solução contendo 100 ppm de Cl<sub>2</sub>) e iodo (solução com 50 ppm de I<sub>2</sub>) foi avaliada frente aos *Staphylococcus* coagulase positiva que formaram biofilmes sobre as placas de microtitulação, de acordo com o método utilizado por Milan *et al.* (2015). Após a última lavagem, as placas com biofilme foram imersas em frascos contendo sanitizantes, onde permaneceram durante 10 min. Alcançado o tempo de contato estabelecido, as placas foram imersas em solução neutralizante (0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) por 30 s. Após lavagem com PBS, foi passada uma zaragatao estéril na superfície de cada placa e realizada contagem em ágar Baird-Parker.

### **3.11 Análise estatística**

Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Foi realizada análise de variância das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa Statistix® (2003).

#### 4 Resultados e Discussão

Todas as 50 amostras de queijo mussarela elaborados com leite de búfala analisadas no trabalho se enquadram nos limites microbiológicos para SCP estabelecidos pela legislação brasileira, pois apresentaram contagens inferiores a  $10^3$  UFC/g (BRASIL, 2001). Vinte amostras estavam contaminadas por SCP, das quais foram obtidos 22 isolados. Os isolados obtidos de uma mesma amostra tiveram a similaridade genética analisada através de rep-PCR. Os perfis de bandas foram idênticos quando comparados entre os isolados oriundos da mesma amostra, indicando que cada amostra estava contaminada por apenas uma cepa de *Staphylococcus*. As 20 cepas isoladas foram identificadas como *S. aureus*.

Dos 20 isolados identificados como SCP, quando submetidos ao teste de formação de biofilme em placas de microtitulação, dois foram classificados como forte formadores de biofilme, sete como moderados formadores, dez fracos formadores e um não formador de biofilme.

A capacidade de formar biofilme por *S. aureus* isolados de mastite bovina e de amostras de leite de vaca já foi demonstrada em outros estudos. Melo *et al.* (2012), ao analisarem a formação de biofilme por *S. aureus* isolados de mastite bovina, verificaram que, de 94 cepas estudadas, 93 (98,9%) foram capazes de formar biofilme. Coelho *et al.* (2011) avaliaram o potencial de formação de biofilme de 50 cepas de *S. aureus* isolados de leite de vaca e observaram formação de biofilme em 80% dos isolados. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos sobre formação de biofilme dirigidos a *S. aureus* isolados de leite de búfala, sendo este o primeiro trabalho que analisa esta propriedade de isolados obtidos de algum derivado lácteo. Embora com diferentes intensidades, 19 cepas foram capazes de formar biofilme, o que demonstra não haver muita distinção entre os isolados de lácteos originados das espécies bovina e bubalina, os quais, em sua maioria, são capazes de formar biofilme.

As duas cepas fortemente formadoras de biofilme (131 e 97) e a única cepa que não formou biofilme (101) foram testadas quanto a capacidade de formar biofilme nas superfícies de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro. As cepas 131 e 97 formaram biofilme nas superfícies de polietileno, aço inox e vidro, indistintamente, ao passo que a cepa 101 apresentou populações que não alcançaram o limite necessário para admitir a formação de biofilme (Tabela 1).

Tabela 1. Cepas formadoras de biofilme (131 e 97) e não formadora (101) em diferentes superfícies.

Superfície	Contagem SCP (Log UFC)*		
	Cepa 101	Cepa 131	Cepa 97
Polietileno	11,61 a	18,00 b	18,84 b
Aço Inoxidável	12,00 a	18,60 b	16,28 b
Vidro	11,76 a	18,74 b	19,06 b

Médias de três repetições\*

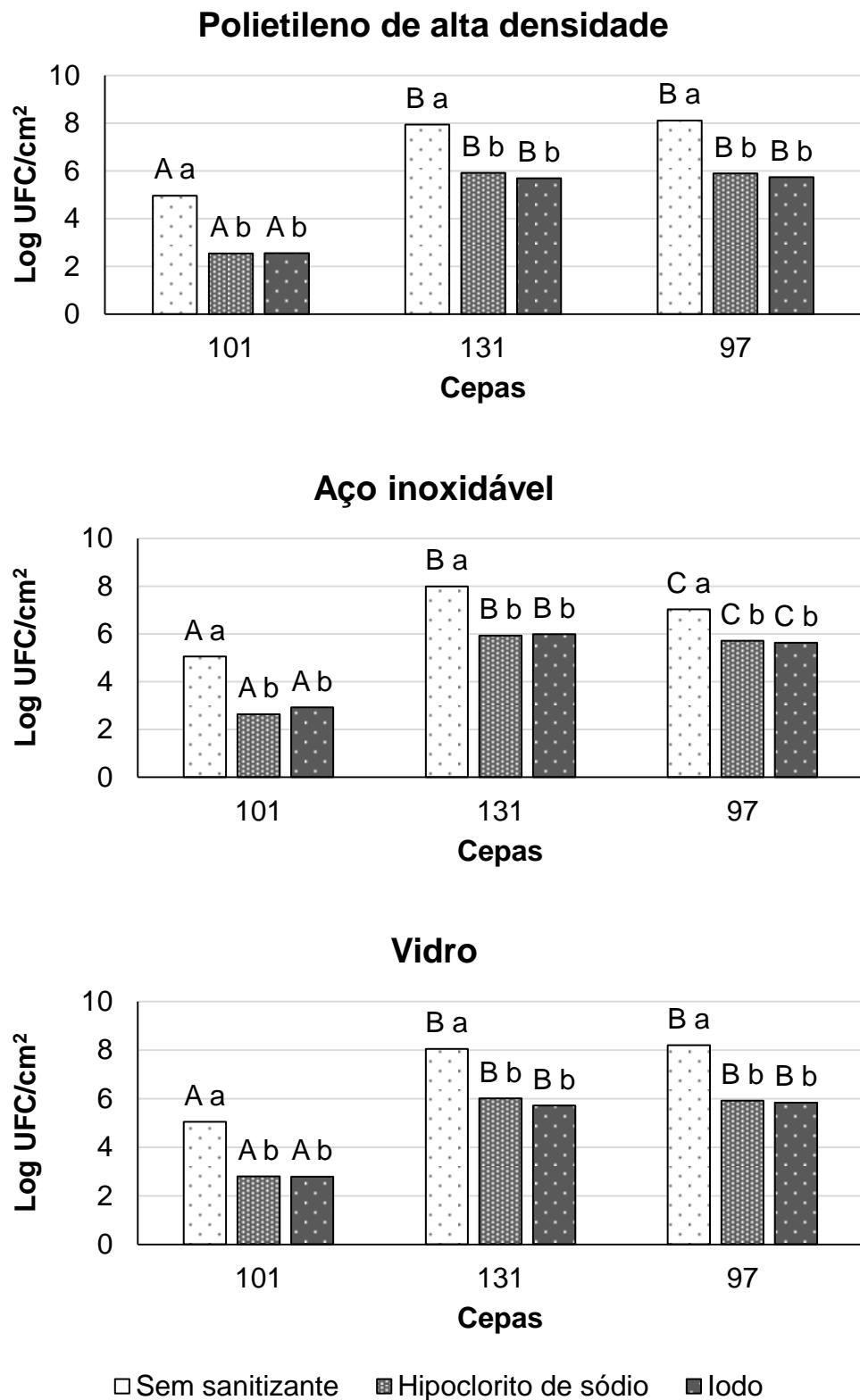
a, b = médias seguidas por letras distintas diferem do teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

A formação de biofilme depende de alguns fatores, entre eles destacam-se as propriedades físico-químicas das superfícies. As hidrofóbicas, como o polietileno, são facilmente colonizadas por micro-organismos. Por outro lado, as hidrofílicas, como as superfícies de vidro e metal, tendem a ser menos susceptíveis a adesão de micro-organismos (RODRIGUES, 2009). Entretanto, estas características não influenciaram a formação de biofilme no nosso estudo, já que as cepas 131 e 97, consideradas forte formadoras de biofilme no teste em placas de microtitulação, desenvolveram biofilme nas três superfícies testadas de forma indistinta. Resultados semelhantes têm sido obtidos por outros autores, como Marques *et al.* (2007) e Santos Júnior *et al.* (2014), utilizando superfícies de aço inoxidável e vidro, e de aço inoxidável e polipropileno, respectivamente. Entretanto estes estudos foram desenvolvidos utilizando uma única cepa de referência da bactéria, o que limita a extração dos seus resultados. Um dos poucos estudos com cepas selvagens de *S. aureus* é o de Boari *et al.* (2009), que constataram a capacidade de *S. aureus* isolados de leite de vaca formarem biofilme em aço inoxidável.

Na indústria de alimentos são utilizados diversos tipos de sanitizantes com o objetivo de tornar a superfície que entrará em contato com o alimento limpa, evitando assim problemas com contaminações microbianas. Deste modo, a sanitização deve reduzir ou eliminar completamente a presença de micro-organismos nas diferentes superfícies (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

A ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo foi avaliada frente às cepas de SCP fortemente formadoras de biofilme (97 e 131) e a não formadora (101). A análise de variância mostrou efeito das cepas e dos sanitizantes sobre os resultados, mas não houve diferença entre os dois sanitizantes. Embora a cepa 101 tenha apresentado significativo decréscimo após a exposição aos sanitizantes, o que

seria esperado, a diminuição nas contagens também foi observada nas cepas 97 e 131 (Figura 1).



A, B, C = letras iguais diferem pelo teste de Tukey quanto à cepa ( $P<0,05$ );  
 a, b = letras iguais diferem pelo teste de Tukey quanto ao sanitizante ( $P<0,05$ ).

Figura1: Contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* formadores de biofilme (cepas 131 e 97) e não formador (cepa 101) em superfície de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro após a ação de sanitizantes.

A aplicação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo promoveu uma redução das populações bacterianas de aproximadamente 2 log em todas as superfícies, tanto das cepas formadoras de biofilme como da não formadora, com exceção da cepa 97 em aço inoxidável, onde a redução foi um pouco menor. Estes resultados mostram que a maior população bacteriana que permaneceu após a ação dos sanitizantes sobre as cepas formadoras de biofilme em relação a não formadora se deveu à maior população inicial encontrada nos biofilmes e não a diferenças de resistência bacteriana ou de acesso do sanitizantes às células bacterianas. Resultados semelhantes foram obtidos por Milan *et al.* (2015), que, trabalhando com cepas de *Salmonella* isoladas de produtos cárneos, chegaram a conclusões análogas às obtidas no nosso estudo.

## 5 Considerações finais

As boas práticas de fabricação adotadas pelas indústrias que processam queijo mussarela de leite de búfala devem incluir medidas para o controle da contaminação por *S. aureus*, uma vez que a maioria das cepas desta bactéria possui a capacidade de formar biofilme nas superfícies de equipamentos e utensílios que tenham componentes de aço inoxidável, vidro ou polietileno de alta densidade. Embora as cepas formadoras de biofilme não sejam mais resistentes aos sanitizantes hipoclorito de sódio e iodo do que as não formadoras, elas atingem maiores concentrações no biofilme, o que resulta em maiores populações bacterianas remanescentes após a aplicação dos sanitizantes.

## Referências bibliográficas

- ABCB. **Associação Brasileira de Criadores de Búfalos.** Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/laticinios.html>>. Acesso em: 12 jan. 2016.
- ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, p. 453-472, 2014.
- 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. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.
- ANDRADE, L. T. A.; NICOLAU, S. E.; MAIA, A. R.; LIMA, R. M. L.; ARRUDA, T. L. M. Avaliação sensorial de queijo mussarela de búfala temperado com pequi. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367-368, p. 3-9, 2009.
- ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W.; LEID, J. G.; POWERS, M. E.; SHIRTLIF, M. E. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence Journal**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J.W. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials Journal**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.
- BEENKEN, K. E; MRAK, L. N.; GRIFFIN, L. M.; ZIELINSKA, A. K.; SHAW, L. N. Epistatic relations hips between *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Plos One Journal**, v. 5, n. 5, p. 1-13, 2010.
- BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.
- BRAEM, G.; DE VLIEGHER, S.; SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; LEROY, F.; DE VUYST, L. (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting for the classification and identification of

coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. **Veterinary Microbioloy**, n. 147, p. 67-74, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução-RDC nº 12, de 02/01/01, **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 7, 10 jan. 2001. Seção I, p. 45-53.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializados de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializados de Alimentos. Resolução-RDC nº 275, de 21/10/02, **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 6, 23 out. 2002. Seção I, p.126.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344>> Acesso em: 15 jan. 2016.

CAMPOS, L. F.; VALENTE, P.; AVANCINI, M. A. C. Atividade dos desinfetantes iodóforo e composto quaternário de amônia sobre *Candida* padrão e isolados clínicos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 4, p. 716-725, 2016.

CASTRO, S. C. A.; JUNIOR, P. R. W.; TAPIA, T. M. D.; CARDOSO, V. G. L. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de queijos do tipo mussarela comercializados no CEASA de Vitória da Conquista-BA. **Alimentos & Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 407-413, 2012.

CHAVES, T. F. Revisão teórica das técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Ciência Equatorial**, v. 2, n. 1, p. 2 -14, 2012.

- COELHO, S. M. O.; PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C.; PRIBUL, B. R.; SOUSA, M. M. S. Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 3305-3310, 2011.
- CUNHA, S. A.; CUNHA, R. M. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Revista Saúde & Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 105-114, 2007.
- DUARTE, S. T.; BARBOSA, L. J. P. L.; BARBOSA, F. H. F. Avaliação microbiológica para detecção de *Staphylococcus aureus* em quadro marcas de queijo tipo mussarela comercializadas no município de Luz, Minas Gerais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 1, p. 66-78, 2011.
- DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, v. 22, n. 1, p. 2-16, 2012.
- FERNANDES, S. A. A. Componentes do leite de bubalinos ao longo da lactação no Estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 60, n. 346/347, p. 71-78, 2005.
- FERREIRA, G. B.; OLIVEIRA, A. C. S.; MARSON, J. M.; TERRA, A. P. S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo “minas frescal” comercializados na região do Triângulo Mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 575-589, 2010.
- FLEMING, L. R.; BOLZAN, N. D.; BANDEIRA, O. S.; NASCIMENTO, S. J. Quantificação e resistência a antibiótico de *Staphylococcus* isolados de queijos. **Perspectiva Ciência Tecnologia**, v. 2, n. 1/2, p. 13-19, 2010.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 424 p.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.
- GANDRA, E. A.; SILVA, J. A.; MACEDO, M. R. P.; MATA, M. M.; SILVA, W. P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* isolated

from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n.1, p.75-81, 2005.

GANDRA, E. A.; FERNANDEZ, M. A.; SILVA, J. A.; SILVA, W. P. Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk. **Revista Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1418-1423, 2016.

GAUTIR, M.; LE LOIR, Y.; BARON, F.; *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MORETRO,T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G. J. Attachment and biofilm formation by food borne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 298-309, 2014.

GUIMARÃES, G.; FRANÇA, A. C.; KRUG, S. F.; PEIXOTO, M. R.; KREWER, C. C.; LAZZARI, M. A.; COSTA, M. M. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1219-1224, 2012.

JANSSENS, J. C. A.; STEENACKRS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; COSTER, D. D.; VERHOEVEN, L. T.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; VOS, E, D.; KEERSMAELKER, J. C. S. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6639-6648, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JORDA, G. B.; MARUCCI, R. S.; GUIDA, A. M.; PIRES, P. S.; MANFREDI, E. A. Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. **Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 9 -12, 2012.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de Biofilme na Indústria de Alimentos e Métodos de Avaliação de Superfícies. Competência: **Revista Científica Eletrônica Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, p.1-23, 2010.

KLUYTMANS, J. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 1, p. 11-15, 2010.

KOELLN, S. T. F.; MATTANA, A.; HERMES, E. Avaliação Microbiológica do queijo mussarela e queijo colonial comercializado na região oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, n. 2, p. 66-74, 2009.

KOMATSU, S. R.; RODRIGUES, M. A. M.; LORENO, W. B. N.; SANTOS, K. A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo minas frescal produzidos em Uberlândia - MG. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

KONG, K.; VUONGA, C.; OTTO, M. *Staphylococcus quorum sensing* in biofilm formation and infection. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2-3, p. 133-139, 2006.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of *staphylococcal* biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 509-524, 2013.

LOPES, O. L.; LACERDA, S. M.; RONDA, B. J. Eficiência de desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastites. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 21, p. 42-57, 2013.

LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 mai. 2017.

MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 475-81, 2010.

MARQUES, C. S.; REZENDE, S. O. G. J.; ALVES, F. A. L.; SILVA, C. B.; ALVES, E.; ABREU, R. L.; PICCOLI, H. R. Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a alguns sanificantes químicos. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 538-543, 2007.

MARTINS, M. C. V.; RODRIGUES, M. A. C.; OLIVEIRA, M. N.; SAMPAIO, T. M. T. Análise do uso de material e produtos químicos na higienização de equipamentos e

utensílios em uma cozinha experimental de preparo de alimentos. **Revista Brasileira de Economia Doméstica**, v. 22, n. 2, p.195-212, 2011.

MENEGARO, A.; FLORES, A. F.; SILVA, F. I.; SBARDELOTTO, P. R. R.; PINTO, E. P. Sanitizantes: concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 2, p. 171-174, 2016.

MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER, F. A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I. G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilme por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**, v. 28, n.1, p. 94-99, 2012.

MILAN, C; AGOSTINETTO, A; CONCEIÇÃO, H. L.; GONZALEZ, C. D. T. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n. 2, p. 642-646, 2015.

MOHAPATRA, B. R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of the five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **Microbiology Letters**, v. 277, p. 98-106, 2007.

NAGASE, N.; SHIMIZU, A.; KAWAN O, J.; YAMASHITA, K.; YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; KOJIMA, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 12, p. 1169- 1172, 2002.

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

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETRA, F. D.; PICCOLI, H. R. Biofilmes Microbianos na Indústria de Alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

OTTO, M. *Staphylococcal* Infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175-188, 2013.

PERIASAMY, S.; CHEUNG, G. Y.; CHATTERJEE, S. S.; OTTO, M. Phenolsoluble modulins in *staphylococci*: What are they originally for? **Communicative & Integrative Biology**, v. 5, n. 3, p. 275-277, 2012.

RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2009.

REYES, V. E.; PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; *Staphylococcal Enterotoxins. Toxins*, v. 2, p. 2177-2197, 2010.

RODRIGUES, B. L.; SANTOS, R. L.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, Z. V.; OLIVEIRA, P. A.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, C. Z.; TAGLIETI, M. R.; DICKE, L. E.; NASCIMENTO, R. V. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 225-230, 2009.

ROSSI, A. C. R; PORTO, E. **A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilmes**. 2009. Disponível em: <[http://www.sbcc.com.br/revistas\\_pdf/ed39/39-Import\\_Higieniz.pdf](http://www.sbcc.com.br/revistas_pdf/ed39/39-Import_Higieniz.pdf)>. Acesso em: 22 jan. 2016.

SALIMENA, S. P. A. Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Revista CES**, v. 28, n. 1. p. 88-102, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 3<sup>a</sup> ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SANTOS JUNIOR, ALEXANDRE, C.; SALIMENTA, A. P.; SANT' ANNA, C. M.; ROBERTA, H. Action of sanitizers on *Staphylococcus aureus* biofilm on stainless steel and polypropylene surfaces. **African Journal Microbiology Research**, v. 36, n. 9, p. 3347-3353, 2014.

SERIDAN, B.; SOUZA, M. R.; NICOLI, J. R.; CARMO, L. S.; MENEZES, L. D. M.; OLIVEIRA, D. L. S.; ANDRADE, E. H. P. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRIS-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus*

*rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 465-470, 2012.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and *quorum sensing*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 96-104, 2014.

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

STATISTIX®. **Statistix 8 analytical software**. Tallahassee, Florida, USA, 2003.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. **JournalMicrobiologicalMethods.**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

TEIXEIRA, V. L.; BASTIANETTO. E.; OLIVEIRA. A. A. D. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 96-100, 2005.

TONHATI, H.; MUÑOZ, C. F. M.; OLIVEIRA, A. J.; DUARTE, C. M. J.; FURTADO, P. T.; TSEIMAZIDES, P. S. Parâmetros genéticos para produção de leite, gordura e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2051-2056, 2000.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VERSALOVIC. J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequencebased polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

WELKER, C. A. D.; BOTH, C. M. J.; LONGARAY, H. S.; HAAS, S.; SOEIRO, T. L. M.; RAMOS, C. R. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

F911e Friedriczewski, Anelise Bravo

Efeito da formação de biofilme por *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala sobre a sensibilidade a sanitizantes / Anelise Bravo Friedriczewski ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Eliezer Ávila Gandra, coorientador. — Pelotas, 2017.

39 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Adesão bacteriana. 2. Patógeno alimentar. 3. Sanitizantes. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Gandra, Eliezer Ávila, coorient. III. Título.

CDD : 641.1