

JOÃO PAULO NATALINO DE SÁ

**INFLUÊNCIA GENOTÍPICA DE ESTIRPES DE *Bacillus cereus* NA ADESÃO
E NA RESISTÊNCIA A SANITIZANTES QUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S211i
2013

Sá, João Paulo Natalino de, 1981-
Influência genotípica de estirpes de *Bacillus cereus* na adesão bacteriana e na resistência a sanitizantes químicos / João Paulo Natalino de Sá. – Viçosa, MG, 2013.
xi, 67 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 57-67.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. *Bacillus cereus*. 3. Aço inoxidável. 4. Adesão - Modelos matemáticos. 5. Genética.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

JOÃO PAULO NATALINO DE SÁ

**INFLUÊNCIA GENOTÍPICA DE ESTIRPES DE *Bacillus cereus* NA ADESÃO
BACTERIANA E NA RESISTÊNCIA A SANITIZANTES QUÍMICOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae

APROVADA: 20 de março de 2013.

Prof. Wilmer Edgard Luera Pena
(Coorientador)

Prof^a. Patrícia Campos Bernardes

Prof^a. Ana Clarissa dos S. Pires

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

Dedico

*Dedico este trabalho à minha guerreira e amada mãe.
Meu porto seguro em todos os momentos da minha vida,
mesmo diante das turbulências e trovoadas da vida!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe: Yêda de Sá, que abdicou de tantas coisas para permitir meus estudos em Viçosa desde a graduação.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades concedidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Nélio, a quem admiro como professor e como pessoa, pelos ensinamentos, orientação, e oportunidades concedidas durante toda vida acadêmica (iniciação científica, bolsa de apoio técnico, bolsa de mestrado...). Seis anos de muito ensino-aprendizado!

Ao professor Wilmer Edgard, pela orientação, colaboração e disposição para ajudar.

À professora Emiliane, pelos ensinamentos, colaboração, amizade e confiança no meu potencial.

À professora Ana Clarissa, pelas sugestões durante a defesa do projeto e pela valiosa ajuda na execução e interpretação da análise estatística.

As minhas irmãs: Patrícia e Renata pela torcida constante.

Aos Meus sobrinhos Pedro e Bernardo: amor e muito amor!

A todos os amigos, e colegas que fizeram e fazem parte desta caminhada, tornado este percurso mais leve, em especial: Carini, Eriane, Daniel, Daniella, Déborah, Fernanda, Gabriela, Gustavo, Hugo, Isadora, Juninho, Jussara, Laélia, Lívia, Luiz Fernando, Mariana D'agosto, Mari Saraiva, Matheus, Michelle, Patrícia, Rafael, Rafaela, Renata, Rodrigo, Sabrina, e Tatiana.

À Patrícia Bernardes, pela oportunidade concedida de iniciar como estagiário no laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) durante seu experimento de mestrado, sempre disposta a sanar meus inúmeros questionamentos, tonando-se uma grande amiga nesta caminhada.

As estagiárias: Paula, Mariana e Daiane, pela contribuição na execução deste trabalho.

Ao Marcos Roberto pelas dicas durante a formatação da dissertação.

A todos os companheiros do LHMA (estagiários voluntários, bolsistas de iniciação, mestrandos e doutorandos!), pelos momentos agradáveis, em especial a Patrícia Érica, pela amizade e cumplicidade durante todos esses anos!

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Enfim, a todos que ajudou direta e ou indiretamente para a realização desta pesquisa, muito obrigado!

BIOGRAFIA

JOÃO PAULO NATALINO DE SÁ, filho de João Natalino Neto e Yêda de Sá nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em março de 2007, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduou-se em julho de 2010, e, em 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A importância da higienização na indústria de alimentos.....	4
2.2. Bacillus cereus	4
2.3. Fatores de virulência associadas à Bacillus cereus	6
2.4. Adesão bacteriana e formação de biofilme	8
2.5. Fatores que influenciam a adesão e a formação de biofilme	9
2.5.1. Teorias.....	9
2.5.2. Hidrofobicidade	11
2.5.3. Medição do ângulo de contato	12
2.6. Sanitizantes químicos	13
2.6.1. Dicloroisocianurato de sódio.....	14
2.5.2. Ácido Peracético (APA)	16
2.5.3. Dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS).....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Superfícies	18
3.2. Micro-organismos utilizados.....	18
3.2.1. Suspensão de células vegetativas.....	19
3.2.2. Suspensão de esporos	19
3.3. Cinética de multiplicação microbiana dos genótipos de Bacillus cereus a 10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C e 42 °C.....	20
3.4. Modelagem secundária utilizando-se o modelo da raiz quadrada	22

3.5. Determinação da adesão bacteriana	23
3.6. Adesão e remoção de células vegetativas e esporuladas de <i>B. cereus</i> aderidas a cilindros de aço inoxidável.....	25
3.6.1. Soluções Sanitizantes.....	27
3.6.2. Avaliação da tensão interfacial dos sanitizantes.....	28
3.7. Avaliação da hidrofobicidade e energia livre das superfícies e da energia livre de adesão.....	29
3.8. Análise estatística	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Avaliação da cinética de multiplicação dos diferentes genótipos de <i>B.cereus</i>	34
4.2. Efeito da temperatura na taxa específica de crescimento máximo(μ_{max})	41
4.3. Adesão bacteriana	44
4.4. Avaliação da adesão e remoção de células vegetativas e esporuladas de <i>B. cereus</i> aderidas a cilindros de aço inoxidável	48
4.5. Avaliação da energia livre de hidrofobicidade (ΔG_{sasTOT}) das superfícies e da energia livre de adesão ($\Delta G_{adesão}$)	52
5. CONCLUSÃO.....	55
6. REFERÊNCIAS	57

RESUMO

SÁ, João Paulo Natalino de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Influência genotípica de estirpes de *Bacillus cereus* na adesão e na resistência a sanitizantes químicos.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadores: Wilmer Edgard Luera Pena e Emiliane Andrade de Araújo

Dentre os diversos micro-organismos contaminantes na indústria de alimentos, encontra-se *Bacillus cereus*, um patógeno que pode causar intoxicação emética, e ou, diarreica e, ainda, deteriorar alimentos pela produção de enzimas lipolíticas ou proteolíticas. Nessa pesquisa, a taxa de multiplicação (μ), o tempo de lag (λ) de quatro genótipos deste micro-organismo com genes para a produção de diferentes enterotoxinas, foi avaliado às temperaturas de 10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C e 42 °C. A quantificação da multiplicação foi realizada utilizando espectrofotômetro, com leitura de densidade ótica a 600nm. O programa DMFit foi usado para ajustar os dados das curvas ao modelo de Baranyi e Roberts. A velocidade específica da multiplicação máxima (μ_{max}) foi determinada pelo modelo de Ratkowsky e colaboradores modificado. Também no experimento, a adesão dos genótipos de *B. cereus* na forma vegetativa e esporulada à superfície de aço inoxidável 304 # 4, a 10 ° e 32 °C foi avaliada. Além disso, avaliou-se a remoção dos genótipos aderidos ao aço inoxidável frente a seis procedimentos de higienização através de teste de uso simulado de limpeza CIP. Como resultado, não se constatou efeito significativo ($p>0,05$) para os valores de μ entre os genótipos à uma mesma temperatura. Porém, houve efeito ($p<0,05$) entre os genótipos para esse parâmetro cinético (μ), nas diferentes temperaturas de incubação (10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C e 42 °C) e, também no tempo de lag (λ). A 10 °C, os valores de μ foram menores e a fase de lag (λ) foi maior para todas as células vegetativas. A 32 °C observou-se um comportamento oposto para todos os parâmetros cinéticos. Nesta pesquisa, não se constatou diferença ($p>0,05$) na capacidade de adesão ao aço inoxidável entre os genótipos à mesma temperatura (10 °C e 32 °C). Porém, houve diferença ($p<0,05$) na adesão das estruturas fisiológicas (vegetativa e esporulada) em relação às temperaturas de 10 °C e 32 °C. A 10 °C, a forma vegetativa aderiu menos do que a esporulada. Este fato pode

correlacionar-se as baixas taxas de μ , e ao longo período de λ . A variação de 22 °C na temperatura foi suficiente para que a adesão das células vegetativas de todos os genótipos fosse quase dois ciclos logarítmicos maior em comparação a 10 °C, confirmando a importância e a influência da temperatura no processo de adesão. A remoção de células vegetativas e esporuladas para os genótipos de *B. cereus* é dependente ($p < 0,05$) do tratamento aplicado, porém, a ação destes agentes não foi afetada pelas estruturas fisiológicas, nem pelos genótipos. As formulações contendo dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS) e dicloroisocianurato de sódio, ou DBSS e ácido peracético, foram as mais eficientes, resultando na higienização do aço inoxidável com uma contagem de *B. cereus* abaixo de 50 UFC/cm². Observou-se que todos os genótipos na estrutura vegetativa, foram consideradas hidrofílicos ($\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}} > 0$) independente da temperatura 10 °C e 32 C). Porém, todos os genótipos esporulados, foram hidrofóbicos ($\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}} < 0$). Pode-se prever que a adesão foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{\text{adhesion}} < 0$) ao aço inoxidável, para os genótipos estudados a 10 °C e 32 °C, para ambas as estruturas fisiológicas, exceto para célula vegetativa do genótipo G4, a 10 °C e 32 °C, onde a adesão foi termodinamicamente desfavorável ($\Delta G_{\text{adhesion}} > 0$). Este trabalho mostrou que fatores físico-químicos e microbiológicos são complementares no fenômeno de adesão bacteriana.

ABSTRACT

SÁ, João Paulo Natalino de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Genotypic influence of *Bacillus cereus* strains in adhesion and resistance to chemical sanitizing**. Advisor: Nelio José de Andrade. Co-advisers: Wilmer Edgard Luera Pena and Emiliane Andrade de Araújo.

Among several micro-organisms contaminants in food industry, *Bacillus cereus* is a pathogen that may cause poisoning emetic and/or diarrheal and, furthermore, spoil foods production of proteolytic or lipolytic enzymes. In this research, the multiplication rate (μ), the lag time (λ) and maximum multiplication rate (μ_{\max}) of four genotypes of *Bacillus cereus* with genes for the production from different enterotoxins were evaluated at temperatures of 10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C and 42 °C. Multiplying quantitation was performed by spectrophotometer, with readings from optical density at 600 nm. The DMFit software was used to fit the data to curves of Baranyi and Roberts model. The maximum multiplication rate (μ_{\max}) was evaluated by modified Ratkowsky et al. model. Also in the experiment, adhesion of genotypes of *B. cereus*, vegetative cell or spore, to stainless steel 304 # 4, at 10 °C and 32 °C was evaluated. The interaction between the surface of stainless steel and genotypes was studied by tension interfacial characteristics and measure of the contact angle of surfaces. In addition, we evaluated the removal of genotypes adhered to the stainless steel surface using six hygienic procedures through simulated use test of cleaning in place (CIP). As result, no significant effect was found ($p > 0.05$) for values of μ between genotypes, at the same temperature. However, was observed significant effects ($p < 0.05$) among genotypes for this parameter (μ) for different incubation temperatures (10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C and 42 °C) and also for the lag time (λ). At 10 °C, the values of μ and μ_{\max} were lower and the lag time (λ) was higher for all vegetative cells of genotypes. At 32 °C there was an opposite behavior for all kinetic parameters. In this study, no difference was observed ($p > 0.05$) in the ability of adhesion to stainless steel between the genotypes at the same temperature (10 °C and 32 °C). However, significant differences ($p < 0.05$) in adhesion in relation to physiological

structures was observed for temperatures of 10 °C or 32 °C. At 10 °C, the vegetative form adhered less than sporulated. This may correlate to low values of μ and μ_{\max} , and long period of λ . The variation of 22 °C in temperature was sufficient for that adhesion of all vegetative cells genotypes were almost two log cycles higher than at 10 °C, confirming the importance and influence of temperature on adhesion process. The effect of temperature on the adhesion of vegetative cells and spores of *B. cereus*, can be explained, among other factors, by hydrophobic interactions. These interactions are governed by the entropy of the system, thus increasing temperature favors the entropic component. Thus, when temperature increases the hydrophobic interactions are become stronger, favoring adhesion. According to results, removal of spores and vegetative cells for genotypes of *B. cereus* is dependent ($p < 0.05$) of the treatment applied, however, the action of these agents was not affected by physiological structure (vegetative and spore), or by genotypes. Formulations containing sodium dodecylbenzene sulfonate combined with sodium dichloroisocyanurate or peracetic acid were more efficient, resulting in hygienization of stainless steel with a count of *B. cereus* below 50 cfu.cm⁻². We observed that all genotypes in the vegetative form were considered hydrophilic ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{TOT}} > 0$), independent of temperature (10 °C and 32 °C). However, all genotypes in the spore form were hydrophobic ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{TOT}} < 0$). The adhesion to stainless steel was thermodynamically favorable ($\Delta G_{\text{adhesion}} < 0$) for all the genotypes at 10 °C and 32 °C for both physiological structures except for the cell vegetative genotype G4 at 10 °C and 32 °C, where the adhesion was thermodynamically unfavorable ($\Delta G_{\text{adhesion}} > 0$).

1. INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia vem gradativamente aprimorando tecnologias e desenvolvendo novos processos para aumentar a qualidade e inocuidade dos alimentos. Um dos aspectos mais importantes neste contexto é a higienização durante todo o processo de fabricação. Atualmente, em função de diversos fatores, como o aumento de concorrência com os produtos importados, consumidores mais exigentes e fiscalização sanitária mais efetiva, muitas indústrias aumentaram os investimentos na qualidade microbiológica do produto.

Dentre os diversos micro-organismos de preocupação na indústria de alimentos encontra-se *Bacillus cereus*, um patógeno alimentar que tem adquirido importância crescente em relação à saúde pública. Apresenta distribuição ubiqüitária na natureza, podendo contaminar diferentes matérias-primas e alimentos. Os esporos produzidos por este micro-organismo são resistentes a diferentes condições adversas, como altas temperaturas, radiações, entre outras, permanecendo viáveis após a cocção dos alimentos.

A maioria das estirpes de *B. cereus* é capaz de produzir uma grande variedade de metabólitos extracelulares, principalmente durante a fase de crescimento exponencial, como fosfolipases, β lactamases e toxinas, as quais são consideradas fatores de virulência associados a surtos de toxinfecções alimentares (diarreica e emética).

A presença de *B. cereus* nas superfícies de equipamentos na indústria de alimentos é muito comum. Essa bactéria possui grande capacidade de aderir a superfícies de aço inoxidável em usinas de leite, sendo assim um obstáculo à conservação do leite pasteurizado e derivados (PENG et al . 2002).

Diversas pesquisas relatam à influência da temperatura sobre a capacidade de adesão dos micro-organismos às superfícies para processamento de alimentos. É possível que a temperatura tenha importante papel na formação de estruturas que auxiliam o processo de adesão. É sabido que temperaturas próximas do ideal para a multiplicação celular permitem maior quantidade de células aderidas.

As características termodinâmicas da superfície celular também podem interferir no processo de adesão. A elevada hidrofobicidade superficial de *B. cereus* pode tornar a célula séssil em uma superfície de processamento, deixando-a, mais resistente aos agentes sanitizantes, antibióticos, tratamento térmico, radiação, dentre outros, quando comparada a sua forma planctônica. Desta forma, o desenvolvimento de compostos que evitem o processo de adesão e formação de biofilmes, tem sido de grande interesse para as indústrias de alimentos, principalmente os sanitizantes com amplo espectro antimicrobiano.

Considerando a importância de contribuir para elucidação de processos como a influência da temperatura na multiplicação microbiana, na adesão e na remoção de micro-organismo da superfície de aço inoxidável, utilizando diferentes sanitizantes químicos, este estudo teve como objetivo:

I. Determinar os parâmetros cinéticos de multiplicação microbiana (taxa de multiplicação e tempo de lag) de quatro diferentes genótipos de *B. cereus* a 10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C e 42 °C.

II. Utilizar o modelo da raiz quadrada, para verificação do efeito da temperatura na taxa de multiplicação de quatro diferentes genótipos de *B. cereus*.

III. Avaliar a remoção de diferentes genótipos de *B.cereus*, na forma vegetativa e esporulada, aderidos ao aço inoxidável, com uso de dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético com presença e ausência de tensoativo aniônico (dodecilbenzeno sulfonato de sódio).

IV. Estudar a interação entre a superfície de aço inoxidável e a superfície de quatro genótipos de *B. cereus*, em suas formas vegetativas e esporuladas, por meio das características de interação interfacial, determinadas a partir da medição de ângulos de contato

das superfícies destes isolados, e do aço inoxidável, em associação com a teoria DLVO Estendida e a teoria termodinâmica da adesão.

V. Fornecer subsídios às indústrias de alimentos, para o controle da deterioração dos alimentos por *B. cereus*, aumentando a segurança dos alimentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância da higienização na indústria de alimentos

A higienização na indústria de alimentos visa basicamente à preservação e manutenção das características sensoriais, nutricionais e da qualidade microbiológica dos alimentos. Desta forma, este processo auxilia na obtenção de produtos que, além das qualidades mencionadas, tenha uma boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo riscos à saúde do consumidor.

O processo de higienização é dividido em duas etapas bem definidas: a limpeza e a sanitização. O objetivo primordial da limpeza é a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras e sais minerais. A sanitização tem por objetivo eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número de micro-organismos deteriorantes a níveis considerados seguros. A limpeza, sem dúvida, reduz a carga microbiana das superfícies, mas não a índices satisfatórios. Por isso, a sanitização é indispensável (ANDRADE, 2008).

2.2. *Bacillus cereus*

B. cereus é um bastonete gram positivo, esporulante, apresentado duas estruturas fisiológicas: endósporo e célula vegetativa. Em condições adversas, esta bactéria produz rapidamente esporos caracterizados pela não alteração do esporângio: elipsóides, e com localização central ou pericentral. A forma esporulada possui uma substância típica em sua estrutura, o ácido dipicolínico (ácido 2,6-piridinedicarboxílico) , que é essencial para a esporulação, germinação e estrutura dos esporos. Esporos não possuem atividade metabólica, sendo resistente a vários fatores ambientais e condições adversas, tais como aquecimento, congelamento, desidratação e radiação. A exposição ao ar não reprime a esporulação e os esporos podem permanecer viáveis durante vários anos (GOMES, 2009).

Os esporos são importantes para a disseminação desta bactéria, e sabe-se que algumas estirpes aderem a células epiteliais humanas, possibilitando ser um mecanismo de virulência adicional (KOTIRANTAET et al. 2000; BHUNIA, 2007; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

As células vegetativas são bastonetes aeróbios facultativos, que variam entre 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento e tendem a crescer em cadeias (BHUNIA, 2007).

A maioria das estirpes é móvel apresentando flagelos peritríquios, apesar de existirem estirpes não móveis. A temperatura de crescimento varia entre 4,0 a 55,0 °C, com a temperatura ótima entre os 25,0 e 37,0 °C. Existe uma fração considerável de estirpes psicotróficas capazes de crescer de 4,0 a 7,0 °C, as quais são frequentemente encontradas no leite e laticínios (BHUNIA, 2007).

Bacillus cereus multiplica em valores de pH entre 4.30 e 9.30 e sua atividade de água (aw) mínima é de 0,93; possui necessidade de três aminoácidos: treonina, leucina e valina, como fatores de multiplicação, mas não necessita de vitaminas (JÄÄSKELÄINEN, 2008).

As espécies deste micro-organismo são frequentemente isoladas de leite, e produtos derivados submetidos ao tratamento térmico, como leite UHT, leite em pó, queijos e iogurte (FAILLE et al , 2001). As influências das enzimas proteolíticas e lipolíticas podem causar inúmeros problemas nestes produtos, e em seus derivados, como alterações na cor e no odor, além de poder ocasionar o processo de coagulação doce em leite UHT (JANSTOVÀ et al. 2004).

A presença de *B. cereus* nos alimentos pode causar toxinfecção alimentar que pode manifestar-se tanto na forma emética como na forma diarreica. Em ambas as formas, os sintomas são geralmente passageiros e auto-limitantes, contudo têm sido descritos casos severos com hospitalização e até mesmo óbito (EHLING-SCHULZ et al. 2006).

2.3. Fatores de virulência associadas à *Bacillus cereus*

O termo virulência (do latim *virulentia*, veneno) refere-se à intensidade ou grau de patogenicidade de um micro-organismo (PRESCOTT et al. 2008). A patogenicidade refere-se ao potencial de um micro-organismo para causar determinada doença.

As características de um micro-organismo que conferem virulência são designadas como fatores de virulência, que é determinada por três características: capacidade de invasão, de infecção e potencial patogênico. O potencial patogênico é dado principalmente pela sua toxicidade, ou seja, pela capacidade de produzir toxinas capazes de provocar determinado malefício ao hospedeiro. (PRESCOTT et al. 2008)

B. cereus pode produzir várias toxinas e enzimas responsáveis pelo seu efeito patogênico, incluindo a toxina emética e as enterotoxinas diarreicas.

.A toxina emética, cereulida, é um dodecadepsipéptido cíclico, de 1,2 kDa, termo-estável, constituído por três repetições de quatro aminoácidos modificados: d-O-Leu-d-Ala-l-O-Val-l-Val (AGATA et al. 1995; EHLING-SCHULZ et al. 2006).

Esta toxina é responsável pela síndrome emética, provocada pela ingestão de alimentos contaminados com cereulida, e caracteriza-se por não fermentar a salicina nem hidrolisar o amido (AGATA et al. 1995). A cereulida é tóxica para as mitocôndrias, atuando como um ionóforo de potássio, e inibem também as células *natural killer* humana.

Existem pelo menos três enterotoxinas (eméticas), associadas a surtos de toxinfecção alimentar: a hemolisina BL (HBL), a enterotoxina não-hemolítica (NHE) e a citotoxina K. A enterotoxina T e a enterotoxina FM não foi, até o momento, reportadas a nenhum caso de toxinfecção alimentar (GRANUM e LUND, 1997; CHOMA e GRANUM, 2002), no entanto estas cinco enterotoxinas são consideradas fatores de virulência associadas a *B. cereus* (MINNAARD et al. 2007).

Este micro-organismo é também produtor de várias enzimas que desempenham papel importante na virulência desta bactéria. Estas enzimas incluem: fosfolipases, lecitinase, esfingomielinase, colagenase, protease, amilase e β -lactamase. (BHUNIA, 2007)

A fosfolipase C é um fator de virulência de inúmeras bactérias patogênicas, contribuindo para a destruição de tecidos através da desgranulação dos neutrófilos humanos (BEECHER et al. 1997).

As β -lactamases conferem resistência aos antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina, já a esfingomielinase hidrolisa a esfingomielina em ceramida e fosforilcolina localizadas nas membranas plasmáticas das células eucariotas (BHUNIA, 2007).

As componentes estruturais de *B. cereus* também são fatores que contribuem para a virulência, por exemplo, os esporos deste micro-organismo, são mais hidrofóbicos em detrimento das espécies do gênero *Bacillus*, favorecendo maior aderência às superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, do que as células vegetativas. A maior hidrofobicidade dos esporos é responsável por aumentar a adesão à superfície das células intestinais, o que contribui como fator adicional a virulência. (ANDERSSON, et al. 1998)

Em isolados de *B. cereus* responsáveis pela doença periodontal, detectou-se a presença de uma camada de glicoproteína, designada *S-layer*, envolvendo a parede celular. A presença desta proteína em torno da parede celular das células vegetativas desta bactéria, desempenha importante função na determinação da hidrofobicidade da superfície celular. As estirpes constituídas por esta proteína são mais hidrofílicas o que lhes permite uma maior aderência ao colagénio tipo I, laminina, fibronectina e ao fibrinogénio e, conseqüentemente, uma ligação efetiva à matriz proteica, a proteína *S-layer* também aumenta a resistência das bactérias à fagocitose (KOTIRANTA et al. 2000)

Não existem relatos na literatura associando os diferentes genótipos enterotoxigênicos de *B.cereus*, com o processo de adesão ao aço inoxidável, e a resistência à sanitizantes. Portanto, esta pesquisa é relevante, pois apresenta um diferencial sobre tais aspectos na tentativa de elucidar esta relação.

2.4. Adesão bacteriana e formação de biofilme

A adesão microbiana é um processo de transferência de uma célula que se encontra livre em uma fase para um estado aderido em uma interface. Este fenômeno está envolvido em várias doenças, na formação de placas dentárias, em processos industriais, dentre outros. Todos esses processos envolvem a interação entre micro-organismos e algum tipo de superfície, que pode ser de materiais inertes ou biológicos (MESQUITA et al. 2002).

A adesão microbiana e a formação de biofilme ocorrem em virtude da deposição de micro-organismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Este processo depende das propriedades físico-químicas do material, do substrato e da superfície da célula. A possibilidade de formar ligações específicas entre a bactéria e superfície depende da composição química da superfície e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE, 2002). Propriedades da superfície da célula, como a presença de flagelo, pili, adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e cápsula, influenciam na aderência a qual ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível (TRACHOO, 2003).

O processo reversível de adesão de um organismo a uma superfície envolve a aproximação deste à superfície de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade (pili superficiais, flagelos dentre outros). Quando o micro-organismo atinge uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre forças atrativas e repulsivas como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de van der Waals, impedimento estereoquímico, entre outras, geradas entre as duas superfícies. A repulsão entre duas superfícies pode ser ultrapassada por meio de interações moleculares específicas, mediadas por adesinas, que são proteínas localizadas em estruturas que irradiam da superfície celular (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Durante a adesão reversível, as bactérias ainda exibem movimentos Brownianos e são facilmente removidas pela aplicação de uma força mínima (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

Após a adesão reversível, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeos que complexam os materiais da superfície e os receptores específicos localizados nos flagelos, pili ou fímbrias. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. Durante este estágio de adesão, os micro-organismos individualizados ou planctônicos podem aglomerar uns aos outros, formando agregados na superfície a que aderem. Após a adesão irreversível da bactéria à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme (FRIEDMAN e KOLTER, 2004).

No biofilme, os micro-organismos são mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como aqueles usados no procedimento de higienização, sendo uma importante fonte de contaminação na indústria de alimentos (MOSTELLER e BISHOP, 1993).

De acordo com Sinde e Carballo (2000), a remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil, e requer aplicação de uma forte força mecânica ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes e/ou por calor.

2.5. Fatores que influenciam a adesão e a formação de biofilme

2.5.1. Teorias

Vários estudos têm descrito o fenômeno de adesão bacteriana em termos de parâmetros físico-químicos, tais como hidrofobicidade (MARK et al. 1987), energia de superfície (ABSOLOM, et al. 1983; BUSSCHER et al. 1984), e interações eletrostáticas das partículas celulares com as superfícies (BAYER et al. 1990).

Segundo Gottenbos et al. (2002), bactérias movem-se ou são movidas para a superfície de um material devido aos efeitos de forças físico-químicas, como movimentos Brownianos, forças de atração de van der Waals, forças gravitacionais, efeitos de cargas eletrostáticas e interações hidrofóbicas.

As interações físico-químicas são classificadas como interações de longo e curto alcance (GOTTENBOS et al. 2002). As interações de longo alcance (distância > 50 nm) entre células e superfícies são descritas por forças, que são em função da distância e energia livre. Interações de curto alcance tornam-se efetivas, quando a célula e a superfície entram em contato estreito (distância < 5 nm) e estas, podem ser divididas em ligações químicas, como pontes de hidrogênio, interações iônicas e dipolo, e interações hidrofóbicas (MAYER et al. 1999).

Algumas teorias têm sido utilizadas para descrever a adesão bacteriana em superfícies. A teoria DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek) desenvolvida inicialmente por Derjaguin e Landau, em 1941, sumariza as contribuições das forças de van der Waals e eletrostáticas para a energia de interação interfacial entre duas superfícies, e explica a adesão de microorganismos com base na interação entre partículas coloidais, desprezando todos os aspectos microbiológicos da adesão. Além disso, as forças de interação contabilizadas por esta teoria são apenas as forças de longo alcance como forças de van der Waals e forças resultantes da dupla camada elétrica (OLIVEIRA, 2006).

Portanto, essa teoria só prevê a adesão inicial, a qual é reversível, mediada por forças de longo alcance, mas não permite quantificar a energia potencial dessa interação. Depois que uma partícula atinge a adesão inicial, um conjunto de forças de curto alcance passa a dominar a interação e a determinar as forças de adesão (CHAVES, 2004).

Em 1948 a teoria DLVO estendida, foi complementada por Verwey e Overbeek para justificar os desvios da mesma, englobando as forças de curto alcance, também designadas forças não DLVO (OLIVEIRA, 2006). As forças de curto alcance englobam as forças de repulsão de Born, as forças de hidratação, as interações hidrofóbicas e as pontes poliméricas. Estas forças permitem justificar os desvios da teoria DLVO, contudo estes tipos de interações não são facilmente quantificáveis com a exceção das interações hidrofóbicas (ELIMELECH, 1995). A hidrofobicidade tem sido considerada a força de curto alcance mais importante na adesão bacteriana (BUSSCHER et al. 1990; van OSS. 1997).

A teoria termodinâmica é a segunda abordagem físico-química que tem sido utilizada para descrever a adesão bacteriana às superfícies (MORRA e CASSINELLI, 1997). De acordo com essa teoria, a adesão é favorecida quando a energia livre por unidade de área da superfície for negativa, devido ao resultado da aderência, o que significa que a adesão espontânea é acompanhada por uma diminuição da energia livre do sistema, como previsto pela Segunda Lei da Termodinâmica. A importância do caráter hidrofóbico da superfície das células na adesão foi explicada por Busscher et al (1990), que defendem que para se estabelecer uma adesão efetiva entre duas superfícies em meio aquoso o filme de água que as separa tem que ser removido e a hidrofobicidade das superfícies interagentes contribui para a facilidade dessa remoção (CHAVES, 2004).

2.5.2. Hidrofobicidade

A hidrofobicidade da superfície celular é baseada em compostos associados com a membrana externa, incluindo lipopolissacarídeos, lipoproteínas e ácidos lipoteicóicos. A orientação destes compostos na membrana externa determina a hidrofobicidade da superfície celular. A maioria das bactérias gram negativas possuem longas regiões de polissacarídeos expostos oriundos de seus lipopolissacarídeos, resultando em superfície hidrofílica, enquanto as bactérias gram positivas possuem porções lipídicas de ácidos lipoteicóicos estendidos para parte externa da célula, resultando em superfície hidrofóbica (TRACHOO, 2003).

Contudo, a hidrofobicidade é a propriedade termodinâmica mais facilmente influenciada pela quantidade de água do meio, sendo assim, os micro-organismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, dependendo do modo de crescimento bacteriano e das condições de cultivo (KUMAR e ANAND, 1998).

Segundo van Oss e Giese (1995), a hidrofobicidade é expressa como energia hidrofóbica de atração e estabelece o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água. A hidrofobicidade é definida em termos de energia livre de interação, (ΔG_{sas}^{TOT}), entre as moléculas das

superfícies (s) imersas em água (a). Quando a energia livre global de interação entre as moléculas imersas em água é atrativa, ou seja, o valor de ΔG_{sas}^{TOT} é negativo, significa que as moléculas do sólido têm maior afinidade entre si do que pela água. Assim, uma superfície hidrofóbica apresenta valores de ΔG_{sas}^{TOT} negativos. Quando a energia livre global de interação entre as moléculas de um sólido imerso em água é suficientemente repulsiva, ou seja, o valor de ΔG_{sas}^{TOT} é positivo, a superfície é considerada hidrofílica.

Dentre os vários métodos usados para determinar a hidrofobicidade, incluem-se a adesão microbiana a hidrocarbonetos, a cromatografia de interação hidrofóbica, a adesão a superfícies hidrofóbicas, agregação por adição de sais, partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico e a medida do ângulo de contato. No entanto, o único método que permite determinar o valor quantitativo da hidrofobicidade é a medida do ângulo de contato, pois os demais fornecem apenas um valor relativo para comparação entre micro-organismos ou superfícies (CHAVES, 2004).

2.5.3. Medição do ângulo de contato

O ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida é o ângulo resultante entre a linha tangente à interface que separa o líquido e o vapor e a linha paralela à superfície do sólido, como evidenciado na Figura 2.



Fonte: VAN LOOSDRECHT et al. 1987.

Figura 1 - Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. As tensões interfaciais da superfície do sólido (γ_s), do líquido em equilíbrio com o vapor (γ_{LV}) e superfície/líquido (γ_{sl}).

Se o líquido for à água, o ângulo formado permite avaliar a molhabilidade da superfície e será relacionada à hidrofobicidade. Qualitativamente, consideram-se a superfície hidrofílica quando o ângulo de contato formado com a água obtiver valores inferiores a 65° e a superfície será hidrofóbica quando o ângulo de contato for superior a 65° (VOGLER, 1998). Entretanto, outros autores como van Oss e Giese (1995), consideram uma superfície hidrofílica quando os ângulos de contato formados pela água sobre uma superfície são inferiores a 50°, para valores superiores trata-se de uma superfície hidrofóbica.

2.6. Sanitizantes químicos

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define desinfetantes como formulações que têm na sua composição substâncias microbidas e apresentam efeito letal sobre micro-organismos não esporulados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

Os desinfetantes mais utilizados na desinfecção de superfícies e equipamentos de indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem os princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

A maioria dos sanitizantes químicos são agentes oxidantes. Assim, podem ter suas atividades reduzidas por compostos inorgânicos e orgânicos presentes no meio a ser tratado. Em inativação química de micro-organismos, o mais importante não é apenas a porcentagem de substância química aplicada, mas também, o residual desta no meio depois que a demanda tiver sido suprida (WICKRAMANAYAKE e SPROUL, 1991).

É importante salientar que a ação dos sanitizantes é afetada pelas características da superfície; pelo tempo, temperatura de contato, concentração de uso, pelos tipos de resíduos presentes nas superfícies, pH, pelas propriedades físico-químicas da água e, ainda, por substâncias inativadoras. O

tipo e a concentração de micro-organismos contaminantes da superfície também influenciam a eficiência do sanitizante. Os esporos são mais resistentes do que as células vegetativas. Certos sanitizantes são mais efetivos sobre bactérias gram-positivas do que gram-negativas. Outros apresentam boa eficiência contra fungos filamentosos e leveduras, mas não sobre vírus ou cistos de protozoários, como os do *Cryptosporidium* e da *Giardia* (ANDRADE, 2008).

Existe grande variedade de sanitizantes disponíveis no mercado. No entanto, a maioria apresenta pequeno efeito sobre a viabilidade dos esporos bacterianos, sendo poucos aqueles com atividades esporicidas. Dentre os sanitizantes que apresentam esta atividade, encontram-se os compostos clorados, o peróxido de hidrogênio e o ácido peracético (RUSSELL, 1991).

2.6.1. Dicloroisocianurato de sódio

Nos últimos anos, observa-se maior preocupação em relação aos problemas ambientais e de saúde causados pelo uso de compostos clorados inorgânicos. Estes compostos reagem mais facilmente formando os trihalometanos (THM), que se originam das reações entre o cloro e as substâncias orgânicas, os ácidos húmicos e fúlvicos, presentes na água.

A importância dos trihalometanos, em nível mundial, está relacionada ao fato de que, além de serem considerados carcinogênicos, são também indicadores da possível presença de outros compostos organoclorados (ácido acético clorado, haloacetoneitros, cloropicrin, clorofenóis, cloropropanonas), também resultantes do processo de cloração das águas e mais perigosos que os próprios trihalometanos (MACÊDO et al. 1999). Em virtude deste problema, a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer classifica esses subprodutos do processo de cloração como cancerígenos e a Agência de Proteção ao Meio Ambiente (*Environmental Protection Agency*-EPA) estabeleceu em 1998, o limite de risco médio para desenvolvimento de câncer, de 60 e 40 miligramas por litro para o clorofórmio e bromofórmio, respectivamente (PAVÓN et al., 2008).

No Brasil, a Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011, estabelece normas e padrões de potabilidade para a água destinada ao consumo humano

em todo o território nacional. Esta portaria atribui o valor máximo permitido de 0,1 mg/L de trihalometanos totais (BRASIL, 2011).

Os compostos clorados orgânicos, conhecidos como cloraminas orgânicas, são produzidos pela reação do ácido hipocloroso com aminas, iminas, amidas e imidas. As mais utilizadas são a cloramina T, a dicloramina T, o diclorodimetilhidantoína, as formas sódicas do ácido dicloroisocianúrico e o ácido tricloroisocianúrico. Esses compostos se apresentam na forma de pó em teores entre 24 % e 90 % de cloro residual total, expresso em Cl₂. Em comparação com os clorados inorgânicos, liberam mais lentamente o ácido hipocloroso, permanecendo efetivos por períodos de tempo maiores e são menos reativos com a matéria orgânica, portanto formam menos trihalometanos e são mais estáveis ao armazenamento (ANDRADE, 2008).

O mecanismo de ação dos compostos clorados orgânicos e inorgânicos, com exceção do dióxido de cloro, é semelhante: quando estão em solução aquosa, liberam ácido hipocloroso, em sua forma não-dissociada, que apresenta ação antimicrobiana. Os mecanismos precisos de ação esporicida ainda são pouco compreendidos, Andrade e Macêdo (1996) sugerem duas teorias que tentam explicar o mecanismo de ação do cloro sobre os esporos, e ambas envolvem a cobertura do esporo. Uma sugere que o cloro se combina e remove proteínas da cobertura e de camadas subsequentes, o que conduz a aumento da permeabilidade ao agente químico e da suscetibilidade à destruição. Já a outra propõe que o cloro estimula a germinação por meio da alteração da permeabilidade da cobertura e, em seguida, inativa o esporo germinado.

Outros pesquisadores propõem que a degradação do córtex do esporo, além da cobertura, é uma parte integrante do processo que permite a penetração do cloro em seu local de ação no protoplasma (BLOOMFIELD e ARTHUR, 1989; RUSSEL, 1991). O córtex tem uma função de proteção rígida e também é responsável por manter baixo nível de água e, conseqüentemente, alta viscosidade no protoplasma, sendo a difusão de agentes antimicrobianos dificultada. No entanto, com a degradação do córtex por agentes germinantes ou por ação do cloro, permite-se a passagem da água e difusão de cloro no protoplasma, causando a morte das células pela oxidação de constituintes

celulares dentro do protoplasma ou membrana do esporo (BLOOMFIELD e ARTHUR, 1989).

Deve-se ressaltar que derivados clorados de origem orgânica, como o dicloroisocianurato de sódio e o ácido tricloroisocianúrico foram certificados para serem utilizados em tratamento químico de água para abastecimento público pela Fundação Nacional de Sanitização dos Estados Unidos, em 2002, não apresentando risco de formação de substâncias potencialmente cancerígenas.

2.6.2. Ácido Peracético (APA)

O ácido peracético comercial é um sanitizante constituído por uma mistura de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante. Algumas formulações contêm, ainda, um ácido orgânico como o octanóico. É produzido pela reação de ácido acético com peróxido de hidrogênio na presença de um ácido mineral como catalisador, geralmente o ácido sulfúrico (ANDRADE, 2008).

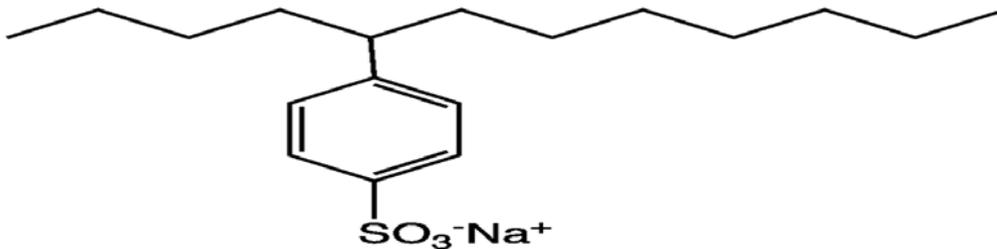
O mecanismo de ação do APA é descrito por Jolivet-Gougeonet et al. (1996) como um rompimento nas ligações sulfídricas e sulfúricas das enzimas que compõe a membrana celular, prejudicando atividades como: o transporte ativo através da membrana e os níveis de soluto dentro das células.

Como todo esterilizante, o ácido peracético possui algumas vantagens: a ação em baixas temperaturas, não sendo corrosivo ao aço inox e alumínio em concentrações recomendadas de uso e não requer enxágue da superfície, sendo inodoro na forma diluída. As desvantagens: baixa estabilidade durante a estocagem, irritante à pele, necessitando muitos cuidados com o manuseio do produto, é incompatível com ácidos, alcalinos concentrados, borrachas naturais e sintéticas, ferro, cobre e alumínio (SANTORO et al. 2007).

Comercialmente, o APA é encontrado nas concentrações de 5 %, 15 % e 45 % (m/v), porém acima de 15 % apresenta risco de explosão, devido a sua instabilidade e reatividade, tornando-se mais conveniente sua comercialização em concentrações mais baixas e com quantidades maiores de estabilizantes como o agente quelante 8-hidroxiquinolina e o agente sequestrante pirofosfato de sódio, que removem traços de metais que aceleram a decomposição de peróxidos (SANTORO et al. 2007).

2.6.3. Dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS)

O DBSS é moléculas anfifílicas, isto é, possuem na sua estrutura duas regiões de polaridades dispares: um grupo polar (ou hidrofílico) e outro apolar (ou hidrofóbico). São classificados como umectantes emulsificantes e, detergentes tensoativos aniônicos, pela capacidade de dissociar-se em solução, sendo o íon negativo liberado, a forma ativa.



Fonte: SMOKEFOOT, 2010

Figura 2 – Estrutural química do dododecilbenzeno sulfonato de sódio.

A parte hidrofóbica é constituída pelos grupos alquil, aril e alquiaril que facilitam a incorporação da gordura, enquanto a parte hidrofílica é constituída de sulfonato (GERMANO e GERMANO, 2003).

Como todo tensoativo, possui a capacidade de modificar a tensão superficial em interfaces líquido-líquido, líquido-gás e sólido-líquido, sendo uma importante característica para o procedimento de higienização, pois tendem a otimizar o contato entre os agentes de limpeza e os resíduos a serem removidos.

A água, ao contrário do que parece, não molha bem a superfície, pois apresenta a alta tensão superficial, equivalente a 72 mJ.m^{-2} . Essa tensão deve ser diminuída a valores de 36 mJ.m^{-2} para otimizar o contato entre o detergente e o resíduo a ser removido. Por isso, numa superfície onde se encontram resíduos de gordura a água apresenta-se na forma de gotículas, pois a interação entre as moléculas de gordura é mais favorável do que entre as moléculas de água e moléculas de gordura.. Essa diminuição da tensão superficial da água é conseguida com o uso de tensoativos. (ANDRADE, 2008).

A molécula do tensoativo forma micelas no interior da solução aquosa. Nesse caso, as partes hidrofóbicas se direcionam para o interior da micela, e

as partes polares interagem com a água. É a formação de micela que permite a remoção dos resíduos de gordura pelo processo de emulsificação realizado pelos tensoativos: a parte hidrofóbica dessas substâncias interage com a gordura e ácidos graxos, insolúveis em água e a hidrofílica com as moléculas de água, formando as micelas, que são solúveis em água.

A concentração de tensoativo em que se inicia a formação de micelas denomina-se “Concentração Crítica de Micela” (CCM). Deshpande et al. (1998), relataram em sua pesquisa o valor de 390 mg/L referente a CCM do DBSS.

Na CCM, a tensão interfacial está em nível mínimo, e a eficiência de limpeza está otimizada. Aumento na concentração de tensoativo em solução além do CCM não causará diminuição da tensão superficial. No entanto, excesso de tensoativo é necessário para manter a CCM, desde que o tensoativo reage com o resíduo a ser removido (ANDRADE, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Superfícies

Foram utilizados cupons-teste de aço inoxidável 304, com polimento nº 4 dimensões 10 mm x 10 mm x 0,05 mm e cilindros de aço inoxidável 304, com polimento nº 4,33 cm de comprimento e diâmetro de 3,1 cm.

3.2. Micro-organismos utilizados

Foram estudados quatro genótipos de *B. cereus* isolados de tanque de resfriamento de leite, de uma fazenda tecnificada, provenientes da pesquisa realizada no laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos por Barreto

2012, que foram identificados por amplificação de fragmentos de DNA. As codificações de cada isolado encontram-se na Tabela 1.

As estirpes G1, G2 e G3 são produtoras de enterotoxinas, e a estirpe G4, foi utilizada como controle negativo, por não possuir a presença de gene para codificar nenhuma enterotoxina.

Tabela 1- Genótipos de *Bacillus cereus*, com seu(s) correspondente(s) fragmento codificador da presença ou ausência de enterotoxina(s).

ISOLADOS				
Genótipo	G1	G2	G3	G4
Fragmento	761pb	421pb	761pb e 421pb	250pb
Toxina	NHE	CytK	NHE e CytK	_____

NHE: enterotoxina não hemolítica, CytK : citotoxina k , pb : pares de bases.

3.2.1. Suspensão de células vegetativas

A partir de cada cultura pura com genótipos de *B. cereus*, mantidas à temperatura de 4°C em tubos de ensaio em ágar inclinado, foram preparadas suspensões contendo cerca de 10⁸ UFC/mL Para o uso nos experimentos, suspensões de células vegetativas foram produzidas em duas repicagens consecutivas em caldo nutriente (Sigma), por incubação à temperatura de 32 °C por 24 h. O número de micro-organismos nas suspensões foi determinado por plaqueamento em meio seletivo MYP (Manitol-EggYolk-Polymyxin - Himedia-) e incubados por 32 °C por 24 h.

3.2.2. Suspensão de esporos

Inicialmente, realizou-se a ativação das colônias conservadas sob-refrigeração, a 4 °C, para tubos contendo ágar nutriente inclinado para cada genótipo. O preparo das suspensões de esporos foi realizado após a terceira

repicagem, quando se obteve uma grande massa de células formadas na superfície dos referidos tubos. A cada um dos tubos, foi adicionado 1 mL de solução salina (0,85 %) para remover a massa celular, com auxílio de alça de platina. Essas suspensões de células foram usadas para inocular, em superfície, no meio de esporulação previamente preparada em frascos Schott de 1.000 mL, devidamente identificados de acordo com o genótipo correspondente.

O meio para cultivo dos esporos foi elaborado conforme proposta de Martin e Blackwood (1972), usando Caldo Nutriente suplementado com 0,01 % (m/v) $MnSO_4$, 1 % (m/v) de amido e 2 % (m/v) de ágar.

Depois de um período de incubação de 48 a 72 h a 35 °C e, em seguida, 72 a 96 h a 5 °C, os esporos de cada frasco foram removidos com auxílio de bastões de vidro estérelizados e suspensos em 20 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, o volume de 20 mL de cada genótipo foi transferido para tubos de centrífuga com capacidade de 50 mL, e levados a centrífuga (Eppendorf 5804R), aplicando-se a programação de 5.000 g por 20 minutos, com temperatura ajustada em 4 °C, adotando procedimento descrito por Wescott et al. (1995). Esse procedimento foi repetido cinco vezes, descartando o sobrenadante, de forma a concentrar as suspensões com concentração maior ou igual a 98 % de esporos refráteis de cada genótipo.

3.3. Cinética de multiplicação microbiana dos genótipos de *Bacillus cereus* a 10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C e 42 °C.

Os parâmetros de multiplicação microbiana: taxa máxima de multiplicação, (μ) e tempo de lag (λ), foram determinados para os genótipos G1, G2, G3 e G4 de *B. cereus*. O objetivo foi determinar o efeito da temperatura (10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C e 42 °C) sobre a multiplicação microbiana dos quatro genótipos isolados.

Todos os isolados foram inoculados em frascos contendo 100 mL de caldo nutriente acrescido de um volume de suspensão de células vegetativas de forma a obter uma contagem aproximada de 1×10^5 UFC/mL. As amostras

foram incubadas de acordo com as condições experimentais (10 ° C, 15 ° C, 25 ° C, 32 ° C e 42 ° C). A quantificação da multiplicação de cada isolado foi realizada por espectrofotômetro modelo SP-22, com leitura de densidade ótica a 600 nm, até que todas as estirpes alcançassem a fase estacionária para cada temperatura experimental.

O software DMFit, gentilmente cedido pelo Dr. Baranyi (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit) foi usado para ajustar os dados das curvas de multiplicação ao modelo de Baranyi (Baranyi e Roberts, 1995) (equações 1 e 2)

$$y(t) = y_0 + g A_n(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{mg A_n(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

$$A_n(t) = \int_0^t \frac{s^n}{\lambda^n + s^n} ds \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

y(t): valores de absorvância,

S: variável da integrante.

m: parâmetro da curvatura após a fase exponencial,

n: parâmetro da fase de latência,

Y_0 : absorvância dos genótipos no momento $t = 0$,

g: taxa de multiplicação microbiana.

Y_{\max} : máxima densidade populacional.

λ : duração da fase lag.

3.4. Modelagem secundária utilizando-se o modelo da raiz quadrada

O efeito da temperatura na taxa de multiplicação (μ_{\max}), foi avaliada pelo modelo secundário de raiz quadrada, de Ratkowsky et al. (1982) modificado, conforme Equação 3. O ajuste dos dados a este modelo foi realizado pelo software Statistica V.7.

$$\sqrt{K} = b(T - T_{\min}) \{1 - \exp [c(T - T_{\max})]\} \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

\sqrt{K} : raiz quadrada da taxa máxima de multiplicação (μ_{\max})

b : inclinação da linha de regressão

T : temperatura

T_{\min} : temperatura abaixo da qual não há crescimento

$T_{m\acute{a}x}$: temperatura limite superior, em que além dela, a taxa de multiplicação predita é zero.

c : é um parâmetro adicional, para capacitar o modelo a ajustar-se aos dados quando as temperaturas estão próximas ou acima da ótima para o crescimento.

3.5. Determinação da adesão bacteriana

Antes de cada análise, os cupons de aço inoxidável (10 mm x 10 mm x 0,05 mm) foram higienizados por meio de escovação empregando-se água e detergente neutro líquido, enxaguados com água destilada e imersos em álcool etílico 70 % (v/v) por 1 h para remoção de gordura, enxaguados novamente com água destilada, secos e esterilizados em autoclave 121 °C/ 15 minutos (PARIZZI, 2004).

Os cupons de aço inoxidável foram imersos em caldo nutriente, quando a adesão foi de células vegetativas, e em água destilada esterilizada para a adesão dos esporos. Em seguida, os inóculos dos diferentes genótipos de *B.cereus* nas formas vegetativas e esporuladas foram inoculados, e realizou-se a incubação, sendo arbitradas duas temperaturas analisadas na cinética de multiplicação: 10° C e 32° C, comparando desta forma uma temperatura de abuso para produtos refrigerados, em detrimento da temperatura ótima de multiplicação do micro-organismo.

Os cupons teste da superfície foram imersos em erlenmeyers contendo 100 mL de caldo nutriente (célula vegetativa) e 100 mL de água destilada esterilizada (esporos) acrescidos, respectivamente, de um volume de suspensão de células vegetativas e esporuladas com seu respectivo genótipo para cada erlenmeyer, de forma a obter uma contagem aproximadamente de 10⁵ UFC/mL. As amostras foram incubadas de acordo com as condições experimentais (10 °C por 108 h e 32 °C por 20 h). As avaliações da quantidade de células aderidas por cm² foram realizadas após o tempo de contato, em cada superfície, que foi padronizado de acordo com o tempo necessário para alcançar a fase estacionária de cada genótipo, analisado pela metodologia descrita anteriormente.

Transcorrido o tempo de incubação, os cupons foram retirados do caldo nutriente e da água destilada esterilizada, com o auxílio de uma pinça esterilizada e imersos em 10 mL de água peptonada a 0,1% (m/v), por 1 min. para a remoção de células planctônicas. Em seguida, os cupons foram imersos em tubos contendo o mesmo volume da solução diluente e submetidos ao vórtex, durante um minuto para remoção de células sésseis (PARIZZI, 2004). Diluições apropriadas foram inoculadas em profundidade, em placas contendo ágar para contagem padrão, com incubação a 32 °C, por 24 h, segundo metodologia da APHA (2001) para determinação de *B. cereus*. Os resultados foram expressos em UFC/cm². O número de UFC/cm² foi determinado usando equação 4:

$$\text{UFC.cm}^{-2} = \frac{(\text{VD/VA}) \times \text{M} \times \text{D}}{\text{A}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

VD: volume do diluente utilizado na rinsagem (mL)

VA: volume da alíquota utilizada no plaqueamento (mL)

M: média da contagem obtida nas placas (UFC)

D: diluição realizada

A: área do cupom (cm²)

3.6. Adesão e remoção de células vegetativas e esporuladas de *B. cereus* aderidas a cilindros de aço inoxidável

Amostras de 100 mL de caldo nutriente para células vegetativas e 100 mL de água destilada esterilizada para esporos foram inoculadas com 1 mL de suspensão com os diferentes genótipos de *B. cereus* (cerca de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL). As suspensões de cada genótipo de *B. cereus* nas formas vegetativa foram ativadas por duas vezes, em caldo nutriente a 32 °C por 24 h. Para as formas esporuladas foram realizadas diluições decimais a partir do inóculo incubado à temperatura de 4 °C, para se obter cerca de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. Estas amostras foram adicionadas em tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento nº 4, com 33 cm de comprimento e diâmetro 3,1 cm (Figura 3), com o intuito de simular o processo de adesão bacteriana.



Figura 3 – Tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento nº 4, com 33 cm de comprimento e diâmetro 3,1 cm e extremidades fechadas com tampas rosqueáveis.

Os tubos de prova foram submetidos a movimentos rotatórios, colocando-os em uma superfície plana a partir de um ponto central e movimentando-os três vezes, no sentido longitudinal para cima, três vezes longitudinalmente para baixo, três vezes, no sentido lateral para direita, três vezes lateralmente para esquerda e por fim três movimentos tipo baliza, realizados manualmente. Este procedimento de movimentos rotatórios foi realizado por seis vezes seguidas, sobre um molde quadrado (46 cm x46 cm) delimitado na bancada do laboratório (Figura 4)

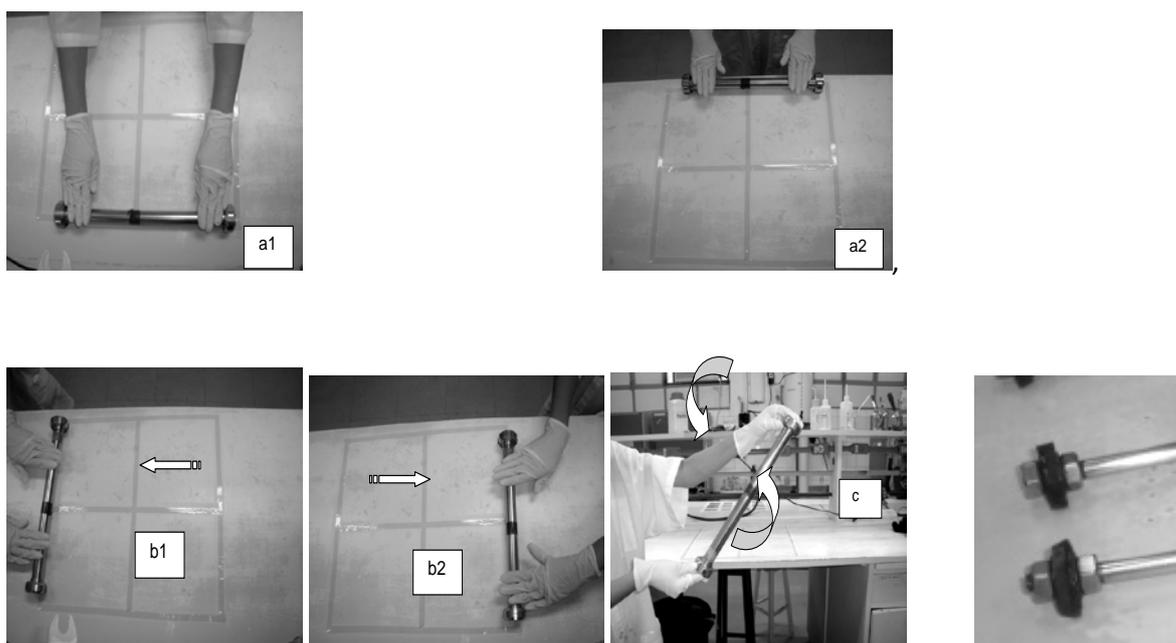


Figura 4 – Movimento rotatório com os cilindros de aço inoxidável (a₁, a₂, b₁, b₂ e c). Haste com disco de neopreno (3,25 cm de diâmetro) em uma das extremidades (d).

Em sequência, os tubos foram incubados a 32 °C e 10 °C, de acordo com os dados obtidos na cinética de crescimento para alcançar a fase estacionária para cada temperatura, para promover o processo de adesão para cada genótipo no cilindro de aço inoxidável. Após a adesão, os inóculos contidos nos tubos de prova foram descartados e os tubos preenchidos com os diferentes tratamentos descrito na Tabela 2, para avaliar a eficiência na remoção de células aderidas. Após o preenchimento, os tubos foram submetidos aos rolamentos como descrito anteriormente.

O número de células aderidas para cada isolado às superfícies dos tubos de prova e que resistiram aos procedimentos de remoção de células foi determinado da seguinte forma: inicialmente as células planctônicas foram removidas pelo preenchimento dos tubos de prova com 100 mL de solução Ringer (0,45 g /L de cloreto de sódio, 0,021 g/L de cloreto de potássio, 0,012 g/L de cloreto de cálcio anidro, 0,01 g/L de bicarbonato de sódio e 10 g/L de tiosulfato de sódio); sendo os tubos posteriormente submetidos a seis movimentos tipo baliza, sendo a solução Ringer descartada.

Novamente, os tubos foram preenchidos com 100 mL solução Ringer e as células e esporos aderidos foram removidas das paredes dos tubos,

usando-se uma haste de aço inoxidável, tendo em uma das extremidades um disco de neopreno com 3,25 cm de diâmetro. O disco de neopreno apresenta quatro orifícios de 3 mm de diâmetro cada, distribuídos um em cada quadrante, uniformemente, para a passagem da solução Ringer.

Essa haste foi empurrada até o fundo dos tubos de prova, por seis vezes seguidas. Estes foram fechados novamente, para que a solução Ringer permanecesse em contato com a superfície por um minuto, e novamente, submetida aos movimentos rotatórios. A partir da rinsagem final com solução Ringer, foram realizadas diluições apropriadas, que foram plaqueadas em profundidade, em placas contendo ágar para contagem padrão, com incubação a 32 ° C, por 24 h, segundo metodologia da APHA (2001) para determinação de *B. cereus*. Os resultados foram expressos em UFC/cm².

3.6.1. Soluções Sanitizantes

Todas as soluções sanitizantes avaliadas foram preparadas a partir do produto comercial concentrado. Utilizou-se o clorado orgânico NIPPO-CLOR (NipponChemical) contendo cerca de 4 % de cloro residual total (CRT) , expresso em Cl₂, e o ácido peracético (Proxitane) com cerca de 15 % de ácido peracético.

Os sanitizantes foram utilizados em diferentes concentrações com adição de 0,2 % (m/v) de dodecilbenzenosulfonato de sódio (Sigma). No experimento, utilizou-se como controle negativo água a 25 °C. As concentrações das soluções utilizadas de cada sanitizante estão apresentadas na Tabela 2.

O pH das amostras foi determinado pelo método potenciométrico utilizando-se o potenciômetro digital (DM 20, Digimed), previamente calibrado com soluções-tampão no pH 4,0 e no pH 7,0.

Tabela 2 - Concentração e pH das soluções sanitizantes preparadas a partir do produto comercial concentrado.

Sanitizante	Concentração	pH
Dicloroisocianurato de sódio	200 mg/L de CRT	6,9
Dicloroisocianurato de sódio + 0,2 % DBSS	200 mg/L de CRT	7,2
Ácido peracético	300 mg/L	3,2
Ácido peracético + 0,2 % DBSS	300 mg/L	3,5
Dodecilbenzenosulfonato de sódio (DBSS)	2000 mg/L	7,18

CRT: cloro residual total, DBSS: dodecilbenzenosulfonato de sódio.

3.6.2. Avaliação da tensão interfacial dos sanitizantes

A medida da tensão interfacial dos diferentes sanitizantes utilizados (Tabela 2) foi feita por meio do equipamento Goniômetro (Kruss®, Alemanha), pelo método da gota pendente, baseado na forma da gota da amostra formada em equilíbrio com os efeitos gravitacionais, que dependem do volume da gota. As imagens das gotas obtidas foram adquiridas por uma câmera e transmitidas a um computador com uma placa gráfica e software DAS 100 para processamento de imagens.

As medidas foram realizadas em condições livres de correntes de ar ou qualquer movimento do dispositivo. As medições da gota foram feitas durante 30 segundos consecutivos, a cada segundo, para cada amostra avaliada. Primeiro foi verificado a tensão superficial da água destilada, que deve ser equivalente a 72 mJ/m^2 . Sucessivamente, foram realizadas medidas nas amostras dos sanitizantes a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.7. Avaliação da hidrofobicidade e energia livre das superfícies e da energia livre de adesão.

Foram determinados os ângulos de contato com três líquidos de polaridades diferentes: água e formamida, com características hidrofílicas, e α -bromonaftaleno, com característica hidrofóbica, para as superfícies avaliadas (Tabela 3) utilizando o equipamento Goniômetro para medição, acoplado com analisador de imagem (Kruss-GmbH)

Tabela 3 - Superfícies avaliadas às temperaturas de 10 °C e 32 °C.

Superfícies
1- Aço inoxidável AISI 304, #4
2 - Superfície de célula vegetativa de <i>B. cereus</i> G 1.
3- Superfície de célula vegetativa de <i>B. cereus</i> G 2.
4- Superfície de célula vegetativa de <i>B. cereus</i> G 3.
5- Superfície de célula vegetativa de <i>B. cereus</i> G 4.
6- Superfície de esporo de <i>B. cereus</i> G 1.
7- Superfície de esporo de <i>B. cereus</i> G 2.
8-Superfície de esporo de <i>B. cereus</i> G 3.
9-Superfície de esporo de <i>B.cereus</i> G 4.

Para os micro-organismos, as medidas do ângulo de contato foram realizadas sobre uma camada de células vegetativas e esporuladas para cada respectivo genótipo, usando o método de gotas séssil descrito por Buscher et al. (1984). Resumidamente, uma camada bacteriana foi depositada sobre um filtro de membrana de acetato celulose de 0,45 μm por filtração a vácuo da suspensão concentrada. Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para Placas de Petri contendo 1% de ágar (m/v) e 10% de glicerol (v/v). As medidas de ângulos de contato foram realizadas a 25 °C para três líquidos com diferentes polaridades, ou seja, água, formamida e α -bromonaftaleno. O mesmo procedimento foi realizado para as respectivas formas esporuladas de cada genótipo.

Os componentes da tensão superficial das superfícies nas condições avaliadas foram determinados pela Equação 5, a partir do uso das informações contidas na Tabela 4 e nos sistema de equações, abaixo apresentadas:

$$(1 - \cos \theta) \gamma_1 = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}) \quad \text{Equação 5}$$

Tabela 4 - Componentes da tensão de superficial de líquidos a 25 °C.

Líquido	Tensão superficial (mJ.m ⁻²)			
	Y ₁ ^{Tot}	Y ₁ ^{LW}	Y ₁ ⁺	Y ₁ ⁻
α-Bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6

Y₁^{Tot} é a tensão superficial total do líquido; Y₁^{LW} é a tensão superficial relacionada as forças de interação ácido-base de Lewis.; Y₁⁺ é a tensão superficial relacionada ao componente acceptor de elétrons do componente ácido-base; Y₁⁻ é a tensão superficial relacionada ao componente doador de elétrons do componente ácido-base.

Sistemas de equações:

$$\text{a) } \gamma_s^{LW} = 11,1(1 + \cos \theta_B)^2 \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{b) } 5,049\sqrt{\gamma_s^+} + 5,049\sqrt{\gamma_s^-} = 36,4(1 + \cos \theta_w) - 15,55(1 + \cos \theta_B) \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{c) } 6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} = 29(1 + \cos \theta_F) - 20,806(1 + \cos \theta_B) \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

γ_1^{LW} : é a tensão superficial relacionada as forças de interação ácido-base de Lewis.;

γ_1^+ é a tensão superficial relacionada ao componente acceptor de elétrons do componente ácido-base;

γ_1^- é a tensão superficial relacionada ao componente doador de elétrons do componente ácido-base.

Pela resolução destas três últimas equações, obtiveram-se as três componentes da tensão interfacial da superfície, γ_s^{LW} , γ_s^+ , γ_s^- , que permitiram calcular a tensão interfacial global da superfície (s), γ_s^{TOT} :

$$\gamma_s^{TOT} = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad \text{Equação 9}$$

$$\gamma_s^{AB} = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-} \right) \quad \text{Equação 10}$$

A energia livre global de interação, ΔG_{sas}^{TOT} , entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (a) foi calculada pelo somatório das componentes apolar (ΔG_{sas}^{LW} - interações de Lifshitz-van der Waals) e polar (ΔG_{sas}^{AB} - interações ácido-base de Lewis) da energia livre global de interação.

$$\Delta G_{sas}^{TOT} = \Delta G_{sas}^{LW} + \Delta G_{sas}^{AB} \quad \text{Equação 11}$$

Sendo ΔG_{sas}^{LW} e ΔG_{sas}^{AB} , as componentes apolar e polar respectivamente, de energia livre global de interação, entre a superfície (s) e a água (a).

A componente apolar foi determinada por:

$$\Delta G_{sas}^{LW} = - 2 (\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_s^- LW} - \gamma_1^+ \alpha^+ LW)) \quad \text{Equação 12}$$

A componente polar calculada por:

$$\Delta G_{sas}^{AB} = - 4 (\sqrt{Y_s^+ Y_s^-} + \sqrt{y_a^+ y_a^-} - \sqrt{y_s^+ y_a^-} - \sqrt{y_a^+ y_s^-}) \quad \text{Equação 13}$$

A energia livre de hidrofobicidade (ΔG_{sas}) foi determinado usando-se os valores dos componentes da tensão superficial. Quando o ΔG_{sas} for negativo a superfície foi considerada hidrofóbica ($\Delta G_{sas} < 0$). Ao contrário, quando o ΔG_{sas} foi positivo a superfície foi considerada hidrofílica ($\Delta G_{sas} > 0$).

A partir dos valores das componentes da tensão interfacial é possível determinar a energia livre total de adesão entre duas superfícies ($\Delta G_{adesão}$). Os valores das componentes das tensões interfaciais são determinados a partir dos valores calculados ou tabelados, das tensões interfaciais das bactérias, das superfícies de adesão e do líquido em que estas duas superfícies se encontram imersas, que neste caso considera-se a água, através das seguintes equações definidas para um sistema bifásico de interação (bactéria/superfície) pela teoria termodinâmica:

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{LW} + \gamma_{bs}^{AB} \quad \text{Equação 14}$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW} \gamma_s^{LW}} \quad \text{Equação 15}$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_b^+ \gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^- \gamma_s^+}) \quad \text{Equação 16}$$

em que γ_{bs} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão, γ_{bl} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/líquido e γ_{sl} é a tensão interfacial entre as superfícies superfície de adesão/líquido.

Como a energia livre está diretamente relacionada à tensão interfacial $\Delta G_{adesão}$ pode ser representado da seguinte forma (CHAVES, 2004):

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad \text{Equação 17}$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad \text{Equação 18}$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad \text{Equação 19}$$

O valor de $\Delta G_{adesão}$ permite fazer uma avaliação termodinâmica do processo de adesão, sendo esta termodinamicamente favorável quando $\Delta G_{adesão} < 0$ e, ao contrário, desfavorável quando $\Delta G_{adesão} > 0$.

3.8. Análise estatística

Nesta pesquisa, foi utilizado um delineamento estatístico inteiramente casualizado num fatorial composto, para avaliar a adesão e a eficiência de sanitizantes frente a diferentes genótipos de *B. cereus*. Os fatores estudados foram respectivamente: genótipo (sendo 4 níveis: G1, G2, G3 e G4), estrutura fisiológica (2 níveis: vegetativa e esporulada) e temperatura (2 níveis: 10 e 32° C), e para a eficiência dos sanitizantes, avaliou-se, além dos fatores mencionados, o fator sanitizante (6 níveis: água, dicloroisocianurato de sódio, ácido peracético, ambos com presença e ausência de DBSS e DBSS).

Posteriormente, estes dados foram analisados por meio da Análise de Variância (teste F) a 5 % de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o teste Tukey, a 5% de probabilidade, todo experimento foi realizado com três repetições, sendo os dados analisados no programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA). Versão 9.2, licenciado para Universidade Federal de Viçosa, 2010.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da cinética de multiplicação dos diferentes genótipos de *B.cereus*.

O perfil referente ao comportamento durante a cinética de multiplicação microbiana dos genótipos de *B cereus* estão apresentados nas Figuras de 5 a 8.

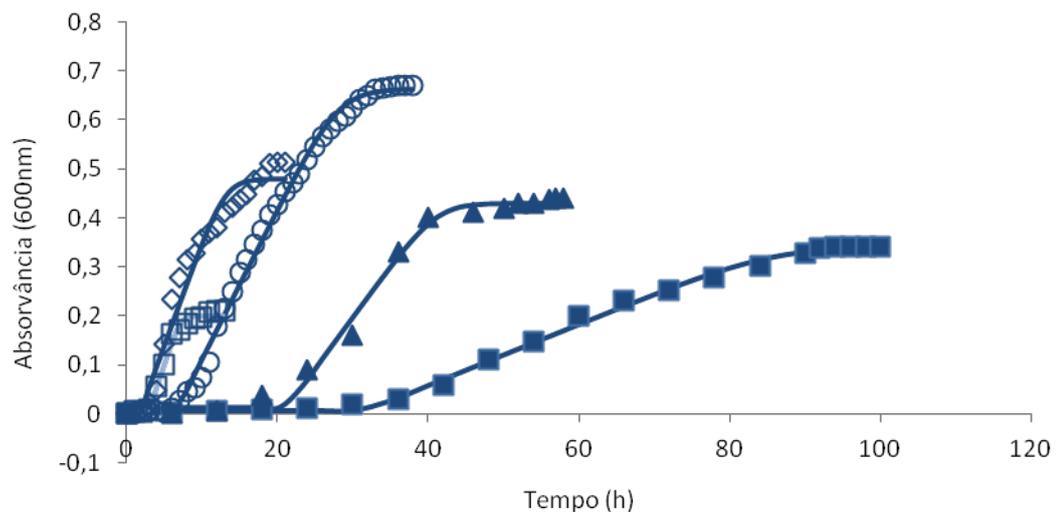


Figura 5 – Curva de crescimento do genótipo G1 incubado a diferentes temperaturas: — Baranyi; ■ 10 °C; ▲ 15 °C; ○ 25 °C; ◇ 32 °C; e □ 42 °C.

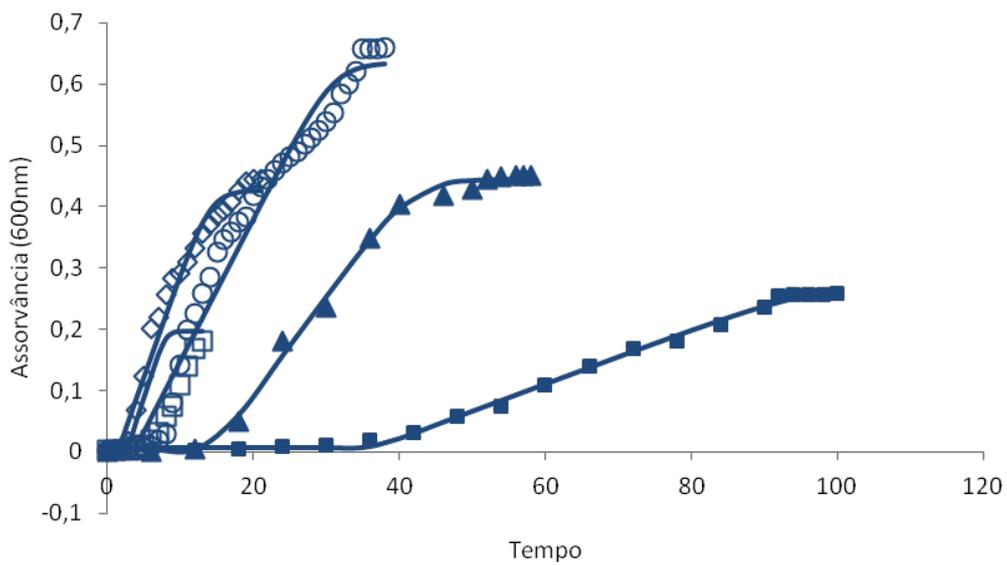


Figura 6 – Curva de crescimento do genótipo G2 incubado a diferentes temperaturas: — Baranyi; ■ 10 °C; ▲ 15 °C; ○ 25 °C; ◇ 32 °C; e □ 42 °C.

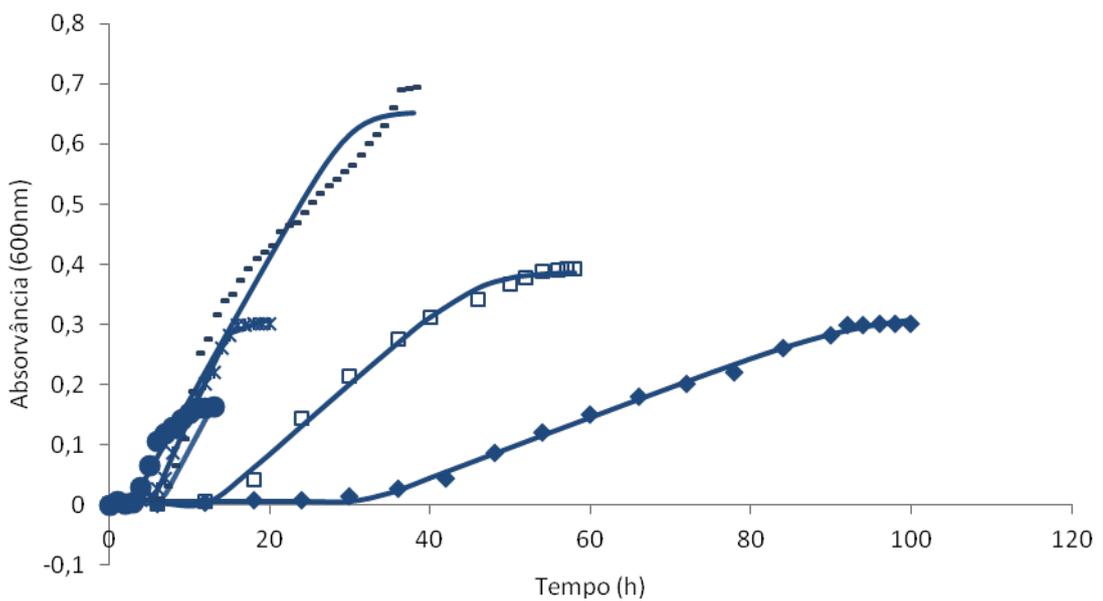


Figura 7 – Curva de crescimento do genótipo G3 incubado a diferentes temperaturas: — Baranyi; ■ 10 °C; ▲ 15 °C; ○ 25 °C; ◇ 32 °C; e □ 42 °C.

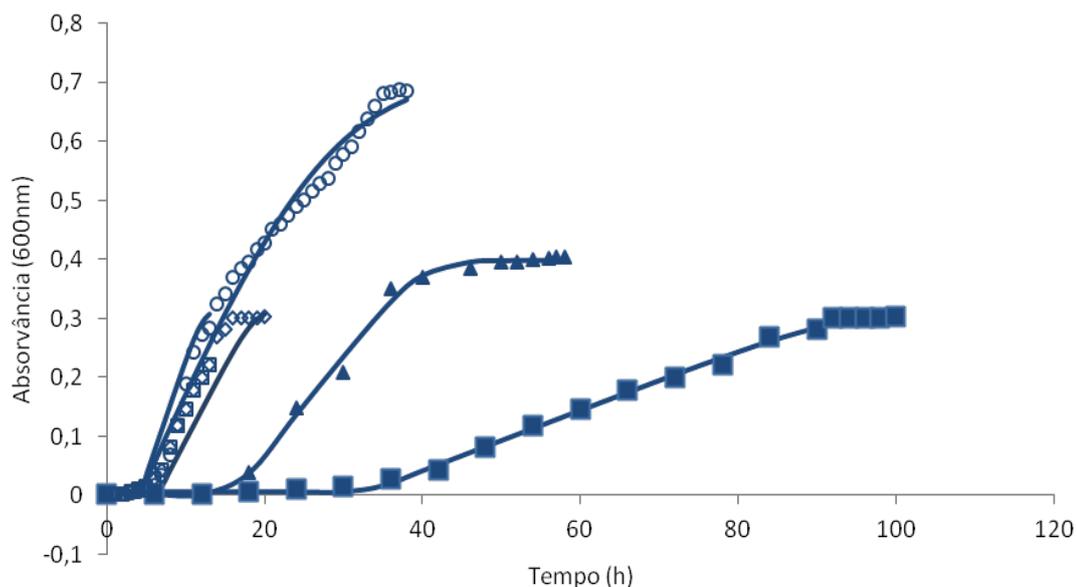


Figura 8 – Curva de crescimento do genótipo G4 incubado a diferentes temperaturas: — Baranyi; ■ 10 °C; ▲ 15 °C; ○ 25 °C; ◇ 32 °C; e □ 42 °C.

O modelo proposto por Baranyi (1995) apresentou bom ajuste estatístico aos dados observados, com coeficiente de determinação alto ($R^2 > 0,95$) para todas as temperaturas e genótipos estudados.

Devido às considerações biológicas e computacionais e outras simplificações pressupostas, esse modelo matemático tornou-se aplicável à multiplicação bacteriana no ambiente dos alimentos. Ele apresenta várias vantagens comparadas a outras funções. O seu uso principal é prever a resposta da multiplicação bacteriana quando há alteração de temperatura durante as fases lag e estacionária.

Segundo Van Impe et al. (2005), o modelo de Baranyi e Roberts é amplamente utilizado por várias razões, dentre elas: facilidade de uso; aplicabilidade sob condições ambientais dinâmicas; boa capacidade de ajuste; e parâmetros biologicamente interpretáveis.

Não foram observadas diferenças, pelo teste de F ($p > 0,05$), nos valores da taxa de multiplicação (μ) entre os genótipos de *B. cereus* a uma mesma

temperatura, mas observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os genótipos de *B.cereus* à mesma temperatura, no tempo de permanência na fase lag (λ), como evidenciado na Tabela 5.

Tabela 5 – Taxas de multiplicação (μ), e tempo de permanência na fase de lag (λ), de genótipos de *Bacillus cereus* incubados a diferentes temperaturas.

Temperatura (° C)	Genótipo	Taxa (μ) *	Lag (λ)h*
10	G1	0,0063	30,03 a
	G2	0,0059	39,12 b
	G3	0,0062	32,01 c
	G4	0,0060	35,42 d
15	G1	0,0164	21,29 a
	G2	0,0162	14,20 b
	G3	0,0159	14,01 b
	G4	0,0161	15,55 c
25	G1	0,0363	6,48 a
	G2	0,036	4,33 b
	G3	0,0358	4,27 b
	G4	0,0366	4,21 b
32	G1	0,0834	2,54 a
	G2	0,0841	2,40 a
	G3	0,0835	2,37 a
	G4	0,0843	2,39 a
42	G1	0,0222	2,47 a
	G2	0,0223	2,49 a
	G3	0,0222	2,46 a
	G4	0,0225	2,44 a

Médias seguidas por letras iguais à mesma temperatura, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

* Média de três repetições

Neste trabalho, observa-se que os genótipos à uma mesma temperatura, não tiveram diferença nas taxas de multiplicação (μ), mas nota-se, maiores taxas entre as temperaturas de 25 °C e, principalmente, à 32 °C (Tabela 5). No entanto, a 10 °C a multiplicação foi menor, com maior tempo de permanência na fase de lag (λ) (Tabela 5), que encontra suporte em relatos de experimentos envolvendo *B. cereus*. Na faixa de temperatura entre 5 °C a 10 °C, Choma et al. (2000), não observaram multiplicação de *B. cereus* em substrato comum,

somente em meio enriquecido e sob determinadas condições de pH e aeração. Somente após 14 dias a 8 °C, Lin et al. (1998), observaram a multiplicação de estirpes psicotróficas, previamente cultivadas em substrato enriquecido e inoculadas em amostras de leite. Dufrenne et al. (1994) não relataram multiplicação para a maioria de 31 cepas de *B. cereus*, depois de quatro semanas de incubação abaixo de 11 °C, ainda que algumas tenham crescido com tempos de geração maiores do que 200 min.

Não foram observados em pré-testes, à temperatura de 7 °C durante 10 dias de incubação, o turvamento em caldo nutriente e, ou multiplicação de colônias em meio seletivo MYP (Manitol-EggYolk-Polymyxin), para nenhum dos genótipos pesquisados.

A baixa taxa de multiplicação obtida a 10 °C pelos genótipos de *B. cereus*, independente do tipo de enterotoxina que possa vir a ser produzida, evidencia que a temperatura de refrigeração utilizada na indústria de alimentos, pode ser uma importante ferramenta para garantir a qualidade microbiológica e segurança alimentar para os consumidores.

Fang et al. (2013), investigaram a cinética de multiplicação de três sorotipos de *Listeria monocytogenes* inoculadas em mamão minimamente processado, e armazenados à diferentes temperaturas (4 °C a 43 °C). Neste estudo, não foram evidenciadas diferença significativa ($p > 0,05$), no comportamento de multiplicação (μ) e nas taxas de crescimento máxima (μ_{max}) dos sorotipos de *L. monocytogenes*.

Souza (2003) avaliou o comportamento de diferentes estirpes (emética e diarréica) de *B. cereus*, inoculados em arroz-doce, submetidos à seis diferentes temperaturas (10 °C, 15 °C, 22 °C, 30 °C, 37 °C e 45 °C), não verificou diferença nas taxas de μ destes isolados à uma mesma temperatura.

Na Espanha, um total de 65 amostras de diferentes sobremesas contendo leite, e *mousse* de frutas, elaboradas em estabelecimentos de hotelaria e restaurantes, foram submetidos a análises microbiológicas, e a contaminação média por *B. cereus* foi estimada em níveis abaixo de 10^2 UFC/g (BUSTO, 2000). Os resultados evidenciam que, quando mantidas sob-refrigeração, as amostras se situaram, geralmente, dentro dos padrões de comercialização e aptas para o consumo.

Essa medida preventiva foi reforçada por Choma et al. (2000) que, estudando o comportamento do patógeno entre 5 °C e 13 °C, enfatizaram que a maioria das estirpes patogênicas de *B. cereus* não são bem adaptadas a baixas temperaturas e ressaltaram a importância do controle das temperaturas de refrigeração, de forma a prevenir o seu desenvolvimento

A 42 °C, a multiplicação de todos os genótipos apresentou taxas de μ menores em comparação à temperatura mais próxima à ótima (32 °C), inferindo-se a proximidade dos limites de temperatura que permitem o crescimento destes genótipos. Borges et al.(2001), analisaram o comportamento de 11 estirpes isoladas de arroz e carne e concluíram que a maioria destas estirpes apresentava multiplicação limitada à 43 °C, ainda que algumas tenham mostrado multiplicação mesmo à 50 °C, após uma fase lag (λ) de 72 h.

O período de lag leva em conta o tempo de adaptação da bactéria às novas condições ambientais e o início da multiplicação celular, evidenciado pelo aumento da turbidez e ou contagens de colônias nas placas. Na Tabela 5, verifica-se que os genótipos estudados obtiveram diferentes comportamentos do período de lag (λ), inferindo-se que a uma mesma temperatura, os genótipos possuem diferentes condições de adaptação. Provavelmente, às temperaturas mais baixas (10 °C, 15 °C e 25 °C) foi uma das possíveis causas da maior permanência nesta fase, uma vez que, em temperaturas de 32 °C e 42 °C, não se observou diferença significativa ($p>0,05$) no tempo de adaptação.

As diferenças genótípicas que levam a possível produção de enterotoxinas parecem não se relacionar ao maior período de lag (λ) para estes genótipos de *B. cereus*. Observa-se que a 10 °C, o genótipo dois (G2), que apresenta genes codificadores da citotoxina k (CytK), possui maior tempo de lag (λ), em comparação com os demais genótipos.

Na temperatura de 15 °C, o genótipo para produção de enterotoxina não hemolítica (NHE), G1, apresentou menor período de fase lag (λ), sendo menor do que a 10 °C.

O tempo de lag (λ), para os genótipos a 32 °C e 42 °C, não evidenciaram diferença significativa, reforçando a temperatura baixa como possível responsável pelas condições de maior tempo de adaptação dos diferentes genótipos a 10 °C, 15 °C e 25 °C.

Gore et al. (2003), relataram que a produção de enterotoxinas por *B.cereus* ocorre a 32 °C, em condições aeróbicas, em meio contendo 1% de carboidratos. Assim, alimentos que contêm elevados níveis de amido, frutose ou lactose, como produtos lácteos, quando estocados entre 20 °C e 25 °C, são mais susceptíveis ao desenvolvimento deste micro-organismo.

Jan et al. (2011), ao analisaram ovo líquido inoculado com *B. cereus*, incubados a 10 °C por cinco dias, não observaram a presença de enterotoxinas, porém à temperatura de 30 °C por 18 h, mais de 50 % dos isolados produziam toxinas.

Outras investigações também relatam que a temperatura a 32 °C como ótima, tanto para a multiplicação quanto para a produção de enterotoxinas (KRAMER, 1989; FERMANIAN et al. 1994)

As pesquisas reportadas são compatíveis com este trabalho, em que, determinado gene de *B cereus* para produção de enterotoxina (s), pode não interferir, nos tempos de adaptação (λ), visto que a 32 °C não foi evidenciado diferenças significativas entre os genótipos em relação ao parâmetro λ .

Estudos mais aprofundados em relação às características fisiológicas destes diferentes genótipos, poderão posteriormente elucidar outros fatores intrínsecos e ou extrínsecos relacionados aos diferentes períodos de lag observados nesta pesquisa.

Em relação à vida de prateleira, observa-se que a deterioração ocorre antes que os micro-organismos cheguem à fase estacionária. Assim, quanto mais longa a fase lag, maior será a vida de prateleira. E quanto maior a velocidade de multiplicação na fase exponencial, menor será a vida de prateleira do produto. Em relação à segurança alimentar, é altamente desejável a maior duração da fase lag e menor velocidade específica de multiplicação dos micro-organismos patogênicos (ROSS e MCMEEKIM , 1994).

4.2. Efeito da temperatura na taxa específica de crescimento máximo (μ_{max})

Estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente, os parâmetros obtidos pelo ajuste do modelo secundário de Ratkowsky modificado, e as equações ajustadas deste modelo para cada genótipo, para determinar a relação entre a taxa específica de multiplicação máxima e a temperatura,

Tabela 6- Parâmetros obtidos pelo ajuste do modelo secundário de Ratkowsky modificado, aos dados experimentais relativos à multiplicação máxima dos genótipos de *B.cereus*.

Genótipos	Parâmetros			
	a	b	Tmin(°C)	Tmax(°C)
G1	0,012	0,232	7 *	45 **
G2	0,016	0,172	7	45
G3	0,012	0,202	7	45
G4	0,01	0,24	7	45

*Temperatura mínima sem multiplicação observada em pré-testes.

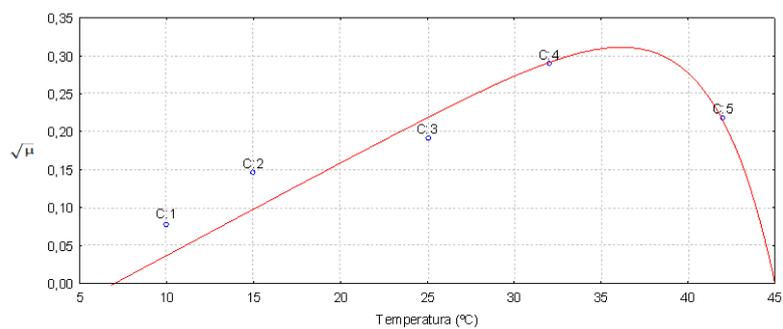
** Temperatura máxima sem multiplicação verificada por Borges et al. (2001)

Tabela 7 - Equações ajustadas do modelo secundário da raiz quadrada, de Ratkowsky para predição da taxa específica de crescimento máximo pelo efeito da temperatura dos genótipos de *B. cereus*.

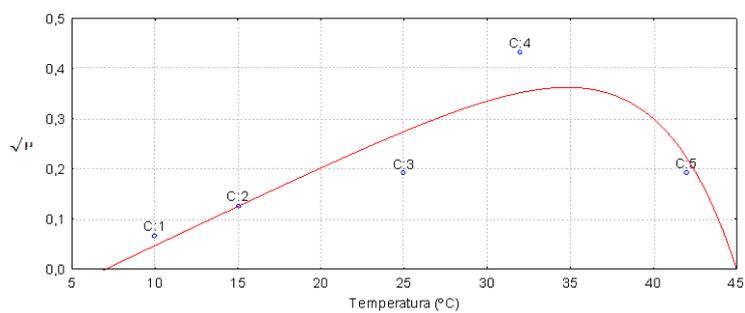
Genótipo	Equação	R ²
G 1	$\sqrt{\mu_{max}} = 0,012(t-7) (1-\exp 0,232(t-45))$	0,90
G 2	$\sqrt{\mu_{max}} = 0,016(t-7) (1-\exp 0,172(t-45))$	0,90
G 3	$\sqrt{\mu_{max}} = 0,012(t-7) (1-\exp 0,202(t-45))$	0,93
G 4	$\sqrt{\mu_{max}} = 0,010(t-7) (1-\exp 0,240(t-45))$	0,94

Na Figura 9, é apresentado o efeito de diferentes temperaturas sobre a influência de μ_{max} , ajustados com o modelo Ratkowsky modificado, para os genótipos G1, G2, G3 e G4.

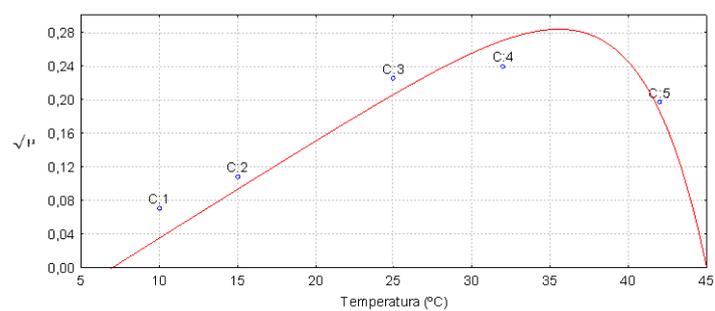
a)



b)



c)



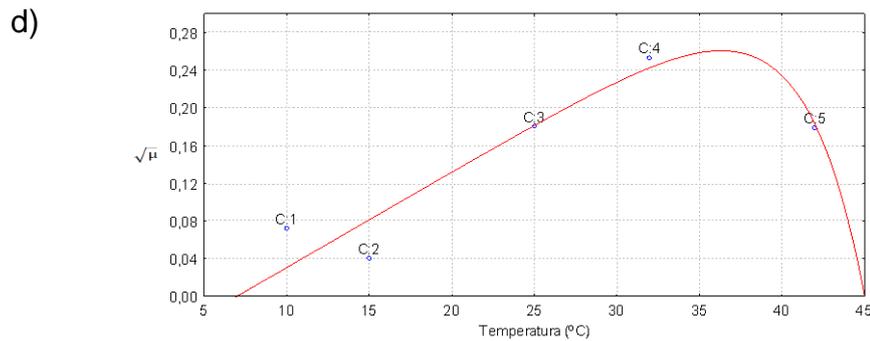


Figura 9 - Valores de multiplicação máxima (μ_{max}) a 10 °C, 15 °C, 25 °C, 32 °C e 42 °C, para cada genótipo (a : G1, b : G2, c : G3 e d : G4)

Observa-se pelos gráficos, que o modelo de Ratkowsky modificado, foi capaz de descrever a relação de μ_{max} com as diferentes temperaturas.(Tabela 8).

Destes resultados conclui-se, que temperaturas baixas (10 e 15 °C) para todos os genótipos, tiveram menores μ_{max} , em comparação à temperatura de 32 °C, que obteve o maior valor. Ressaltando a importância do armazenamento de alimentos à baixa temperatura, que pode proporcionar maior vida útil e menores risco à saúde do consumidor.

O menor valor de μ_{max} obtido a 10 °C e 15 °C pode estar relacionado ao maior tempo de permanência na fase de lag nestas temperaturas(Tabela 6)

A 25 °C e 42 °C, pode-se inferir que as taxas de μ_{max} dos genótipos pesquisados tiveram valores aproximados em comparação com as demais temperaturas.

Grijpspeerdts e De Reu (2005), utilizaram o modelo de Ratkowsky para prever o crescimento de *B. cereus* e *Enterobacter cloacae* em ovo líquido, verificando a influência da temperatura (15 °C e 20 °C) sobre a multiplicação destes micro-organismos. O modelo primário de Baranyi combinado com o modelo secundário de Ratkowsky descreveu um bom ajuste, com coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,95, demonstrando a viabilidade destes modelos para o uso na microbiologia preditiva.

Em outro estudo, avaliando este mesmo modelo secundário, Posada-Izquierdo et al. (2013), obtiveram bom ajuste de determinação ($R^2 > 0,80$) na avaliação da influência de diferentes temperaturas de armazenamento (4 °C, 8

°C, 13 °C e 16 °C), sobre a taxa de μ_{\max} de *Escherichia coli* O157: H7, inoculada em alfaces minimamente processadas.

De acordo com os dados reportados, verifica-se que o modelo utilizado nesta pesquisa, possui confiabilidade e viabilidade para prever a multiplicação dos genótipos de *B. cereus*.

4.3. Adesão bacteriana

Avaliou-se a adesão dos quatro genótipos de *B. cereus*, em relação às temperaturas de 10 °C e 32 °C, nas estruturas vegetativas e esporuladas. O período de incubação para todos os genótipos para cada temperatura foi padronizado de acordo com o tempo necessário para alcançar à fase estacionária (Figuras de 5 a 8)

A adesão não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), pelo teste de F, a uma mesma temperatura entre os diferentes genótipos. Porém, houve efeito significativo ($p < 0,05$) em relação à temperatura (10 °C e 32 °C) para as estruturas fisiológicas no processo de adesão (Tabela 8).

Tabela 8 – Logaritmo do número de UFC/cm² de células vegetativas e esporos de *Bacillus cereus* aderido em cupons de aço a 10 e 32 °C.

Estrutura	Temperatura (°C)	LogUFC/cm ² *
Vegetativa	10	2,38 a
	32	5,21 b
Esporulada	10	4,32 c
	32	4,56 d

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

* Média de três repetições.

Pode-se inferir de acordo com a Tabela 8, que a 10 °C, a forma vegetativa dos genótipos de *B. cereus*, aderiu em menor quantidade em relação à estrutura esporulada para todos os genótipos. Este fato pode correlacionar-se à baixa taxa de multiplicação (μ), ao longo período de permanência na fase de lag (λ) (Tabelas 5 e 6), e à baixa taxa de multiplicação

máxima (μ_{\max}) destes genótipos (Figura 9). Outro fator seria a hidrofobicidade da estrutura esporulada superior à célula vegetativa destes genótipos, conforme resultados discutidos posteriormente.

A variação de 22 °C foi suficiente, para que a adesão das células vegetativas de todos os genótipos obtivessem quase dois ciclos logarítmicos a mais em comparação a 10 °C, demonstrando a importância e a influência da temperatura no processo de adesão, que pode ser explicado pela maior taxa μ o menor λ e a maior μ_{\max} , verificado para todos os genótipos a 32 °C.

Observa-se que a 32 °C, a estrutura vegetativa aderiu em maior quantidade. Isso pode ter ocorrido, pelo fato de a 10 °C, a bactéria não produzir apêndices celulares que contribuem para maior adesão, predominando os fatores físico-químicos, como a hidrofobicidade superficial, que é maior para os esporos. Porém, a 32 °C, apêndices celulares podem ser produzidos por células vegetativas, e os “fatores microbiológicos” sobrepõem aos físicos-químicos, resultando em maior adesão das células vegetativas.

A influência da temperatura sobre a adesão de células vegetativas pode ser explicada, dentre outros fatores, pela cinética de multiplicação da bactéria. Assim, para *Salmonella* Typhimurum, a elevação da temperatura até 38 °C favoreceu o metabolismo deste micro-organismo, sendo atribuída essa resposta à maior absorção e metabolização dos nutrientes, e conseqüentemente maior adesão das células vegetativas ao aço inoxidável com o aumento da temperatura. Por outro lado, baixas temperaturas diminuíram o tempo de geração de células, bem como à adesão à superfície (SANTOS, 2004).

Ponce (2007), ao analisar a adesão em superfície de aço inoxidável de dois fenótipos de *Enterobacter cloaca*: estirpe 067 (selvagem) com uma estirpe transconjugante, que sintetiza a enzima lactonase, responsável pela hidrólise de acil homoserina lactonas (AHLs), moléculas sinal do sistema *quorum sensing*, não encontrou diferença significativa na adesão à superfície de aço inoxidável, após o período de 48 horas de incubação, seja pela observação microscópica dos cupons ou pela contagem de células aderidas

Peng et al. (2002), pesquisando o processo de adesão à superfície de aço inoxidável, durante diferentes fases de multiplicação de *B. cereus* em caldo de soja, concluíram que o número de células aderidas à superfície,

aumentou acentuadamente à medida que a cultura atingiu o final da fase log, com início da fase estacionária.

Diferentes pesquisas já reportaram a importância da temperatura na adesão microbiana às superfícies. Hood e Zottola (1995) observaram que, *Yersinia enterocolitica* aderiu melhor na superfície de aço inoxidável a 21 °C do que a 10 °C ou 35 °C, isto porque esta bactéria não produz flagelo a 35 °C, o que influenciou a capacidade de adesão. Estudos mostraram que a adesão de *Listeria monocytogenes* à superfície de aço inoxidável também é influenciada pela temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (MAFU et al. 1991; PEREZ et al. 1999).

Bernardes (2008), ao analisar o processo de adesão de células vegetativas de *B. cereus* em diferentes temperaturas (4 °C, 7 °C, 10 °C, 15 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C), e tempos de incubação (1, 5,5 e 10 dias) à superfície de aço inoxidável, constatou diferença significativa ($p > 0,05$) da temperatura sobre a taxa de adesão, obtendo a 10 °C durante 10 dias de incubação, uma contagem de 1,16 log UFC/cm², comparado a uma adesão de 4,43 log UFC/cm² a 35 °C por 10 dias, ou seja, mais de 3 ciclos log.de diferença.

Segundo Anderson et al. (1998), os esporos de *B. cereus* aderem com facilidade às diferentes superfícies, sendo essa capacidade de adesão devido a três características: alta hidrofobicidade, baixa carga de superfície e morfologia dos esporos, já que possuem apêndices, que também são responsáveis pela adesão. Sabe-se que a adesão desses esporos às superfícies da linha de processamento e aos equipamentos da indústria constitui problemas para a obtenção de alimentos com qualidade

Embora não tenham sido reportados na literatura trabalhos específicos, que quantifiquem a adesão de genótipos enterotoxigênicos de *B. cereus* em superfície de aço inoxidável, estes parecem não influenciar este processo de adesão, visto que o genótipo quatro (G4), que não possui gene para codificação de nenhuma enterotoxina, aderiu da mesma forma ($p > 0,05$) ao aço inoxidável frente aos demais genótipos enterotoxigênicos.

O efeito da temperatura sobre a adesão de células vegetativas e esporos de *B. cereus* (Tabela 10), também pode ser explicado, entre outros fatores, pelas interações hidrofóbicas. Estas interações são regidas pela entropia do sistema, portanto o aumento da temperatura favorece a componente entrópica (Equação 20). Desta forma, à medida que a temperatura aumenta, as interações hidrofóbicas se tornam mais fortes, favorecendo a adesão.

$$dG = dH - TdS \quad \text{Equação 20}$$

em que : dG= variação da energia livre de Gibbs; dH= variação da entalpia, T= temperatura, dS= variação da entropia

Tauveron et al. (2006), ao analisarem sete estirpes esporuladas de *B. cereus* isolados de pacientes com sintomas diarréicos, verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na sua morfologia (comprimento e número de apêndices) quando aderidos ao aço inoxidável a 30 °C. A capacidade de aderência foi superior (log de 5 UFC/cm²) quando os esporos estavam rodeados por apêndices de maior comprimento em detrimento de estirpes que apresentavam apêndices menores (log de 4 UFC/cm²)

A adesão verificada neste pesquisa, assemelha-se parcialmente, aos dados reportados por Tauveron et al. (2006), podendo inferir que as diferentes formas esporuladas em diferentes temperaturas (10 °C e 32 °C), podem apresentar diferentes ou iguais características morfológicas, contribuindo de maneiras distintas para o processo de adesão. Estudos mais aprofundados com uso de microscopia de força atômica podem elucidar estas possíveis diferenças morfológicas em diferentes temperaturas.

4.4. Avaliação da adesão e remoção de células vegetativas e esporuladas de *B. cereus* aderidas a cilindros de aço inoxidável

Não foram observadas contagens de células vegetativas nas placas incubadas a 10 °C por quatro dias para nenhum dos genótipos, após o uso do procedimento simulado de limpeza CIP para todos os tratamentos. Isso representa contagens < 0,30 UFC/cm², inferiores àqueles propostos pela American Public Health Association(APHA), que é de 2 UFC/cm² para se considerar um superfície corretamente higienizada. Infere-se que a baixa taxa de multiplicação e a elevada permanência durante a fase de lag, em sinergismo com a ação mecânica e o uso das formulações, foram suficientes para a remoção das células dos cilindros de aço inoxidável, reforçando a importância do armazenamento de alimentos em baixas temperaturas.

Na Tabela 9, encontra-se o valor da tensão superficial (mJ/m²) de cada tratamento utilizado.

Tabela 9 - Tensão superficial de diferentes tratamentos utilizados para remoção de *B. cereus* em uso simulado.

Tratamento	Tensão interfacial (mJ/m ²)
Água	72,19 *
DCIS	72,65
DCIS + DBSS	27,89
APA	72,58
APA + DBSS	30,46
DBSS	33,85

DCIS: dicloroisocianurato de sódio; DBSS: dodecilbenzenosulfonato de sódio, APA: ácido peracético.

*Média de três repetições.

Os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11 demonstram que os procedimentos de remoção de células vegetativas e esporuladas para os diferentes genótipos de *B. cereus*, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Porém, a eficiência de remoção destes agentes não foi afetada ($p > 0,05$) pela estrutura fisiológica (vegetativa e esporulada).

Tabela 10 – Logaritmo de UFC/cm² de células vegetativas de *Bacillus cereus* aderida após a remoção com agentes sanitizantes a 32°C em tubos de aço inoxidável empregado no teste de uso simulado.

Remoção de células vegetativas	
Tratamento	Log UFC/cm ²
Água	2,94 a
DCIS	1,71 b
DCIS + DBSS	1,56 c
APA	1,78 b
APA + DBSS	1,52 c
DBSS	1,94 d

Médias seguidas por letras iguais em uma mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). DCIS: dicloroisocianurato de sódio, DBSS: dodecilbenzenosulfonato de sódio; APA: ácido peracético * Média de três repetições

Tabela 11 – Logaritmo de UFC/cm² de células esporuladas de *Bacillus cereus* aderida após a remoção com agentes sanitizantes em tubos de aço inoxidável empregado no teste de uso simulado.

Remoção de esporos	
Tratamento	Log UFC/cm ²
Água	2,94 a
DCIS	1,72 b
DCIS + DBSS	1,52 c
APA	1,72 b
APA + DBSS	1,53 c
DBSS	1,95 d

Médias seguidas por letras iguais em uma mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). DCIS: dicloroisocianurato de sódio, DBSS: dodecilbenzenosulfonato de sódio; APA: ácido peracético
* Média de três repetições

A comparação entre a eficiência da água por ação mecânica e dos diferentes sanitizantes por ação química apresentou efeito significativo ($P < 0,05$) (Tabelas 10 e 11). A remoção das células vegetativas e esporuladas dos diferentes genótipos pela água podem ter ocorrido devido à força de atrito da água sobre a superfície dos cilindros de prova, ou seja, apenas a ação mecânica gerada pelo escoamento do fluido pela superfície.

Faille et al. (2013), avaliaram os efeitos mecânicos e químicos sobre a remoção de 12 estirpes esporuladas pertencentes ao grupo de *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*) e de espécies de *Bacillus* menos relacionadas ao *B. cereus* (*B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. sporothermodurans*, *B. subtilis*) durante a limpeza CIP (cleaning in place). Os esporos aderidos foram submetidos à ação mecânica e química, este último envolvendo NaOH a 0,5% (m/v) à temperatura de 60 °C. Os resultados revelaram que apenas o uso da ação mecânica, retirava entre 53 a 89 % dos esporos aderidos ao aço inoxidável, a uma tensão de cisalhamento de 500 Pa. Por outro lado, na presença de NaOH a uma tensão de cisalhamento de 4 Pa, os esporos foram facilmente retirados, com remoção entre 80 e 99 %, reportando o efeito de sinergismo entre agentes químicos e físicos. Estes resultados sugerem que a ação química desempenha um papel fundamental no processo de limpeza CIP.

O uso de cloramina orgânica (dicloroisocianurato de sódio a 200 mg/L de CRT) e ácido peracético (300 mg/L) sem DBSS, não diferiram entre si ($p > 0,05$) para a remoção das estruturas fisiológicas, independente do genótipo, porém houve maior remoção em comparação com a água ($p < 0,05$)

Existe concordância entre algumas pesquisas de que o hipoclorito de sódio é igual ou mais eficiente sobre esporos do que o ácido peracético. Moraes (1996) avaliou a resistência de cinco isolados de esporos de bactérias aeróbias mesófilas de equipamentos de abatedouro de aves pelo teste de suspensão. As soluções contendo dicloroisocianurato de sódio (150mg/L de CRT), e ácido peracético (300mg/L), por 30 minutos de contato, obtiverem 2,2 RD na população de esporos mesófilos.

Verifica-se que as melhores condições de remoção bacteriana foram alcançadas quando se utilizaram os sanitizantes formulados com o tensoativo aniônico dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS) a 0,2 % (m/v), tanto para

remoção de células vegetativas, como para os esporos da superfície do aço inoxidável. Portanto, ressalta-se a importância deste agente sobre a formulação de sanitizantes, que tem como objetivo diminuir a tensão superficial da água, facilitando o contato do sanitizante com a superfície.

Sagong, et al. (2013) avaliaram a redução do número de três estirpes esporuladas de *B. cereus* (10876, ATCC 13061, e W-1) inoculadas conjuntamente, em alface e cenouras, através de dois tratamentos: ultra-som (isoladamente), e em combinação com agentes tensoativos (Tween 20, 40, 60, 80, 85, e Span 20, 80, e 85), em concentrações variando entre 0,03 a 0,2 % (m/v) em suspensão por 5 minutos. O tratamento mais eficaz para a redução do número de esporos de *B. cereus* foi a combinação de ultra-som com 0,1 % de Tween 20. As reduções foram de 2,49 e 2,22 log UFC / g de alface e cenouras, respectivamente, sem provocar a deterioração da qualidade. Estas reduções foram 90 % maior do que aquelas obtidos por imersão em 200 mg/L de cloro residual durante 5 minutos.

Não existe para superfícies de processamento de alimentos, um padrão, mas recomendações que devem ser utilizadas como referências, para as condições higiênicas. Segundo (APHA), uma superfície é considerada corretamente higienizada, quando o número de mesófilos aeróbios é até 2 UFC/cm². Por ser considerada uma recomendação rígida, outras instituições como a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) admitem contagens de até 50 UFC/cm² de mesófilos aeróbios à superfície (ANDRADE, 2008).

Sobre tais aspectos, infere-se que somente os tratamentos utilizando cloramina orgânica (dicloroisocianurato de sódio) e ácido peracético, ambos com adição de DBSS, atenderam as recomendações da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e Organização Mundial de Saúde (OMS) de até 50 UFC/cm² (equivalente a log 1,70 UFC/cm²) de mesófilos aeróbios.

4.5. Avaliação da energia livre de hidrofobicidade (ΔG_{sas}^{TOT}) das superfícies e da energia livre de adesão ($\Delta G_{adesão}$)

Na Tabela 12, encontram-se os valores referentes à energia livre de hidrofobicidade (ΔG_{sas}^{TOT}) e da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) entre os diferentes genótipos de *B. cereus* (vegetativa e esporulada) com o aço inoxidável em meio aquoso.

Tabela 12 – Valores da energia livre global de interação (ΔG_{sas}^{TOT}) e da energia livre total de adesão ($\Delta G_{adesão}$) de genótipos de *Bacillus cereus* e aço inoxidável.

Genótipo	Estrutura	Temperatura (°C)	ΔG_{sas}^{TOT} (mJ/m ²) *	$\Delta G_{adesão}$ (mJ/m ²) *
G1	Vegetativa	10	9,275	-3,3529
G2	Vegetativa	10	3,793	-4,1564
G3	Vegetativa	10	3,800	-4,7476
G4	Vegetativa	10	22,853	3,3709
G1	Vegetativa	32	6,065	-3,5558
G2	Vegetativa	32	5,502	-3,0596
G3	Vegetativa	32	3,941	-4,6179
G4	Vegetativa	32	17,899	1,5625
G1	Esporulada	10	-23,914	-29,6162
G2	Esporulada	10	-31,062	-33,0423
G3	Esporulada	10	-39,883	-37,8385
G4	Esporulada	10	-48,594	-41,5852
G1	Esporulada	32	-21,65	-28,2424
G2	Esporulada	32	-28,752	-31,6487
G3	Esporulada	32	-28,287	-31,3753
G4	Esporulada	32	-29,486	-32,2811
Aço inoxidável			-23,603	-

*Média de 3 repetições.

Nota-se uma variação na energia livre global de interação (ΔG_{sas}^{TOT}) entre os diferentes genótipos sobre a mesma estrutura e temperatura. Porém estes resultados encontram suporte na literatura, em que se percebe que uma grande variação na hidrofobicidade pode ser observada entre gêneros de bactérias e estirpes da mesma espécie.

De acordo com a Tabela 12, observa-se que todos os genótipos na estrutura vegetativa foram considerados hidrofílicos ($\Delta G_{sas}^{TOT} > 0$), independente da temperatura (10 e 32 °C), sendo a superfície do genótipo G4 a mais hidrofílica nas duas temperaturas.

Para as estruturas esporuladas, a energia livre global de interação foi negativa ($\Delta G_{sas}^{TOT} < 0$), sendo classificados como hidrofóbicos. O motivo pelo qual o esporo bacteriano apresenta forte hidrofobicidade não é ainda bem entendido. Sabe-se que a adesão desses esporos às superfícies da linha de processamento e aos equipamentos da indústria constitui problemas para a obtenção de alimentos com qualidade (ANDRADE, 2008)

Esporos de *B. cereus* têm importância na indústria de laticínios, pois, quando se apresentam em números iguais ou superiores de 10^6 UFC/mL ou g, podem causar doenças através dos alimentos, além de produzirem proteases e fosfolipases extracelulares, resultando na coagulação doce no leite UHT e no sabor amargo do leite pasteurizado (COLLINS, 1981).

Ahimou et al. (2001) analisando a hidrofobicidade pelas técnicas de ângulo de contato e coluna de interação hidrofóbica da superfície de nove estirpes de *Bacillus subtilis*, verificaram que a hidrofobicidade variou de acordo com a estrutura fisiológica (vegetativa ou esporulada), constatando que os esporos, independente da estirpes estudada, tendem a serem mais hidrofóbicos do que as células vegetativas.

Teixeira et al. (2005) mediram os ângulos de contato com água, formamida e di-iodometano de várias estirpes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus lactis lactis*, *Staphylococcus sciuri* e *Enterococcus faecalis*). Estes autores verificaram que todas as estirpes de *Lactobacillus lactis lactis* bem como de *Enterococcus faecalis* eram hidrofóbicas. Já as estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus sciuri* apresentaram maior variação dentro da mesma espécie, sendo algumas consideradas hidrofóbicas e outras hidrofílicas.

A análise de hidrofobicidade não permite o grupamento das estirpes ou espécies de acordo com sua taxonomia microbiológica. Alguns fatores são capazes de influenciar a hidrofobicidade celular, como a fase em que o micro-organismo se encontra a presença dos apêndices celulares, as substâncias poliméricas excretadas e a composição do meio (ARAÚJO, 2009)

De acordo com a teoria termodinâmica da adesão, esta é favorecida se a variação da energia livre por unidade de área da superfície for negativa, o que significa que a adesão espontânea é acompanhada por uma diminuição da energia livre do sistema, como previsto pela Segunda Lei da Termodinâmica. Nesse contexto, pode-se prever que a adesão foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{\text{adesão}} < 0$) ao aço inoxidável, para todos os genótipos estudados, independente da temperatura (10 e 32 °C) e da estrutura fisiológica (vegetativa ou esporulada). A exceção foi às células vegetativas do genótipo G4, às temperaturas de 10 °C e 32 °C em que a adesão foi termodinamicamente desfavorável ($\Delta G_{\text{adesão}} > 0$), (Tabela 12), ressaltando que este genótipo (G4), não possui presença de gene para produção de nenhuma enterotoxina.

A adesão da bactéria à superfície é um dos primeiros passos para a formação do biofilme. Com a determinação da hidrofobicidade é possível prever se a adesão é termodinamicamente favorável ou não, auxiliando medidas preventivas que evitem ou amenizem este processo, assegurando produtos alimentícios de melhor qualidade e maior segurança aos consumidores, sendo a higienização na indústria de alimentos, uma ferramenta primordial para reduzir a possibilidade deste processo.

5. CONCLUSÃO

A cinética de multiplicação de *B. cereus* não foi influenciada pelos genes codificadores das enterotoxinas estudadas. Entretanto, à temperatura próxima à ótima (32 °C) os valores (μ) e (μ_{\max}) foram maiores e os períodos de fase lag menores, comparando-se às temperaturas inferiores (10 °C, 15 °C e 25 °C).

A 43 °C, todos os genótipos tiveram uma velocidade máxima (μ_{\max}), e taxa de multiplicação (μ), similar de 25 °C, podendo-se inferir a que essa temperatura está no limite de multiplicação destes genótipos a 45 °C.

Os resultados indicaram que abusos na temperatura de armazenamento, influenciam decisivamente o número de bactérias aderidas, podendo alterar a qualidade dos produtos, e ou, riscos à saúde do consumidor.

A adesão ao aço inoxidável 304 #4 (UFC/cm²) foi diferente de acordo com a estrutura fisiológica (vegetativa ou esporulada), e com a temperatura (10 °C ou 32 °C). Os genes que codificam a expressão de enterotoxinas parecem não influenciar no processo de adesão de *B. cereus*.

Em relação aos procedimentos de higienização no teste de uso simulado para remoção de células vegetativas e esporos dos diferentes genótipos, a aplicação do ácido peracético e do dicloroisocianurato de sódio formulados com dodecilbenzeno sulfonato de sódio foram os mais eficientes, apresentando menores contagens (UFC/cm²) nas superfícies do aço inoxidável. A associação entre sanitizantes e tensoativos mostrou efeito sinérgico na remoção de células vegetativas e esporos aderidos.

A adesão foi termodinamicamente favorável ($\Delta G_{\text{adesão}} < 0$) entre o aço inoxidável 304 #4 e os genótipos de *B. cereus* independente da estrutura fisiológica e temperatura, exceto para a célula vegetativa do genótipo G4, onde a adesão foi termodinamicamente desfavorável ($\Delta G_{\text{adesão}} > 0$). Assim, a interação entre os genótipos que podem produzir enterotoxinas, foi favorecida pelo aspecto termodinâmico da adesão, independente da temperatura de incubação (10 °C e 32 °C)

Em relação aos aspectos microbiológicos, parece que a presença dos genes codificadores das diferentes enterotoxinas pelas estirpes de *B. cereus*,

não influenciaram os valores de μ , λ , ao processo de adesão ao aço inoxidável e na hidrofobicidade, nas condições experimentais.

Este trabalho mostrou que fatores físico-químicos e microbiológicos são complementares no fenômeno de adesão bacteriana.

6. REFERÊNCIAS

ABSOLOM, D. R., LAMBERTI, F. V., POLICOVA, Z., ZINGG, W., van OSS, C. J., NEUMANN, A. W. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, p.90 - 97, 1983.

AGATA, N., OHTA, M., ARAKAWA, Y., MORI, M. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. **Microbiology**, v.141, p. 983 - 988, 1994.

AHIMOU , F., PAQUOT , M., JACQUES, P., THONART, P., ROUXHET, P. G. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiological Methods**, v.45, p. 119 - 126, 2001.

ANDERSSON, A., GRANUM, P. E., RONNER, U. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 93 - 99, 1998.

ANDRADE, N.J., MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 182p, 1996.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, cap.4, p. 185 – 228, 2008.

ARAÚJO, A.E. **Caracterização físico-química e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata obtidas por uma nova síntese**. 2010. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

BARANYI, J.; ROBERTS, A.T. Mathematics of predictive food microbiology. Int. **Journal Food Microbiol**, v.26, p.199 - 218, 1995.

BARRETO, J. M. O. **Fatores de virulência de *Bacillus cereus* isolado na cadeia produtiva do leite na microrregião de viçosa, Minas Gerais**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

BAYER, M. E.; SLOYER, J. L. The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. **Journal of General Microbiology**, v.136, p. 867 - 874, 1990.

BEECHER, D. J., SCHOENI, J. L., WONG, A. C. L. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4423-4428, 1995.

BERNARDES, P. C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão**. 2008. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens - mechanisms and pathogenesis. **West Lafayette**: Springer, p. 135 - 149, 2007.

BORGE, G.I.A.; SKEIE, M.; SORHAUG, T.; LANGSRUD T.; GRANUM, P.E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 237- 246, 2001.

BUSSCHER, H. J.; SJOLLEMA, J. van DER MEI, H. Relative Importance of Surface Free Energy as a Measure of Hydrophobicity in Bacterial Adhesion to Surfaces. In : Doyle, R. J. and Rosenberg, M. (Eds). Microbial cell surface hydrophobicity. **American Society of Microbiology**, Washington, D. C, 1990

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.; VAN DER MEI, H. C.; VAN PELT, A. W.; DE JONG, H. P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 980 - 983, 1984.

BUSTO, P.M.B. Calidad microbiologica de los postres lacteos elaborados en establecimientos de hosteleria de la cominidad autonoma del pais Vasco durante 1999. **Alimentaria**, v. 37, n. 318, p. 31-33. 2000.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. Minho, Braga: Universidade do Minho, Portugal. 2004. 156p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidad do Minho, Braga, 2004.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Institute of Food Technologists**, v.2, p.22 - 32, 2003.

CHOMA, C.; CLAVEL, T.; DOMINGUEZ, H.; RAZAFINDRAMBOA, N.; SOUMILLE, H.; NGUYEN-THE, C.; SCHMITT, P. Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 73 - 77, 2000.

CHOMA, C., GRANUM, P. E. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. **Microbiology Letters**, v.217, p.115 -119, 2002.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, 1981.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.O. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.847 - 867, 2000.

DUFRENNE, J.; SOENTORO, P.; TATINI, S.; DAY, T.; NOTERMANS, S.
Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food-production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 99 - 109, 1994.

DESHPANDE, S.; SHIAU, J. B.; WANDE, D.; SABATINI, A. D.; HARWELL, H.
J. Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. **Water Research**. v. 33, p. 351 - 360, 1999.

EHLING-SCHULZ, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; MONTHÁN, A.; BERGE, O.;
FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic
Bacillus cereus. **Microbiology Letter**, v. 260, p. 232–240, 2006.

ELIMELECH, M.; GREGORY, J.; JIA, X.; WILLIAMS, R. Particle Deposition and
Aggregation-Measurements, Modelling and Simulation. **Colloid and Surface
Engineering Series**, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, 1995.

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

FAILLE. C., BÉNÉZECH, T., BLEL, W., RONSE, A., CLARISSE, M.,
SLOMIANNY, C. Role of mechanical vs. chemical action in the removal of
adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. **Food Microbiology**, v. 33,
p.149 - 157, 2013.

FANG, TING., LIU, YANHONG ., HUANG, LIHAN. Growth kinetics of *Listeria*
monocytogenes and spoilage. **Food Microbiology** , V.34, P. 174 – 181, 2013.
microorganisms in fresh-cut cantaloupe

FERMANIAN, C.; FREMY, J.M.; CLAISSE, M. Effect of temperature on the
vegetative growth of type and field strain of *Bacillus cereus*.. **Letters in Applied
Microbiology**, v. 19, p. 414 - 418, 1994.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R.. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. **Molecular Microbiology**, v.51, p.675 - 690, 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2003

GOMES, I. L. **Pesquisa de enterotoxinas em isolados alimentares do grupo *Bacillus cereus***. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- UNIVERSIDADE TECNICA DE LISBOA, 2009.

GOTTENBOS B, BUSSCHER HJ, VAN DER MEI HC, NIEUWENHUIS P. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.13. p. 717 - 722, 2002.

GORE, H.M.; SPIRA, W.M.; KIM, H.U. Real-time molecular beacon NASBA reveals hblc expression from *Bacillus* spp.. **Milk. Biochem. Bioph**, v. 311, p. 386 - 390, 2003.

Granum, P. E., Lund, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letter**, v. 157, p. 223 – 228, 1997.

GRIJSPEERDT, KOEN., DE REU, KOEN. Practical application of dynamic temperature profiles to estimate the parameters of the square root model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p.83 – 92, 2005.

HOOD, S., ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**. v. 6,p. 8 -18, 1995.

JÄÄSKELÄINEN, E. **Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food.**, University of Helsinki, Helsinki, p. 74, 2008.

JAN, S.; N. BRUNET.; TECHER ,C.; LE MARÉCHAL, C., KONÉ, A. Z.; GROSSET ,N., COCHET, M.F., GILLARD, A., GAUTIER, M., PUTERFLAM,J.,

BARON, F. Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected on farm and in egg product industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p.261 - 265, 2011.

JOLIVET-GOUGEON, A.; BRAUX, A. S.; SAUVAGER, F.; ARTURO-SCHAAN, M.; CORMIER, M. Influence of peracetic acid on *Escherichia coli* H10407 strain in laboratory microcosms. **Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 60 - 65, 1996.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 77-87, 2002.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections, **Microbes and Infection**, v. 2, p. 189 – 198, 2000.

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

LIN, S.; SCHRAFT, H.; ODUMERU, J.A.; GRIFFITHS, M.W. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p.159 - 171, 1998.

MACÊDO, J.A.B.; ANDRADE, N.J.; ARAÚJO, J.M.A.A.; CHAVES, J.B.P.; SILVA, M.T.C.; JORDÃO, C.P. Quantificação de trihalometanos (THM) em amostras de água pré e pós-cloradas com hipoclorito de sódio (HPCS) por cromatografia de fase gasosa utilizando-se microextração em fase sólida (MEFS). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 310, p. 22 - 27, 1999.

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; SAVOIE, L. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria Monocytogenes* to

surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1969 - 1973, 1991.

MARTIN, J.H.; BLACKWOOD, P.W. Effects of sub-lethal heat-shock, Balanine, and L-alanine on germination and subsequent destruction on *Bacillus* spores by pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 5, p. 577 - 580, 1972.

MARK, C.; VAN LOOSDRECHT, M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p.1893 –1897, 1987.

MAYER, C.; MORITZ, R.; KIRSCHNER, C.; BORCHARD, W.; MAIBAUM, R.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H-C. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p.3 -16, 1999.

MESQUITA, L.M.S.; LINS, F.A.F.; TOREM, M.L. Biobeneficiamento mineral: Potencialidades dos micro-organismos como reagentes de flotação. Rio de Janeiro: CETEM/MCT. **Série Tecnologia Mineral**, V. 81, p. 35, 2002.

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

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

MORRA, M.; CASSINELLI, C. Bacterial adhesion to polymer surfaces: A critical review of surface thermodynamic approaches. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, vol. 9, p.55 - 74, 1997.

MOSTELLER, T.M., BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v. 56, n.1, p.34 - 41, 1993.

OLIVEIRA, K.M.P. **Adesão de *Salmonella* Enteritidis em diferentes superfícies de processamento de alimentos**. Londrina, P: Universidade Estadual de Londrina, 115p. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, 2006.

PARIZZI, S. Q. F., ANDRADE, N. J., SOARES, N. F. F., SILVA, C. A. S., MONTEIRO, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77- 83, 2004.

PAVÓN, J. L. P.; MARTÍN, S. H.; PINTO, C. G.; CORDER, B. M. Determination of trihalomethanes in water samples: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.629, p. 6 - 23, 2008.

PENG, J. S. W. C. TSAI.; C. C. CHOU. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p.11-18, 2002.

PEREZ, E.; SALIERON, F. J.; ALBISU, J AND CASWS, C. Formación de películas biológicas en la industria alimentaria. **Food Science Technology International**, v. 5, p. 25 - 30, 1999.

PONCE, R.A. **Características fenotípicas controladas pelo sistema *quorum sensing* em *Enterobacter cloacae***. 2007. 71f. Dissertação (Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

POSADA-IZQUIERDO, G.D., PÉREZ-RODRÍGUEZ , F., LÓPEZ-GÁLVEZ , F., ALLENDE, A., SELMA, M. V., GIL, M. I., ZURERA, GONZALO. Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: Chlorine washing and modified atmosphere packaging. **Food Microbiology**, v. 33, p. 131 - 138, 2013.

Prescott, Harley, e Klein's. **Microbiology** (7ª ed.). Nova Iorque: McGraw Hill, 2008.

RATKOWSKY, D.A.; OLLEY, J. ; MCMEEKIN, T.A.; BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v.149, p.1- 5, 1982.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 241- 264, 1994.

RUSSEL, A. D. Chemical sporicidal and sporostatic agents. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4th. ed. Pennsylvania: Lea e Febiger, 1991.

SAGONG, H., CHEON, H., KIM, S., LEE, S., PARK, K., CHUNG, M., CHOI, Y., KANG, D. Combined effects of ultrasound and surfactants to reduce *Bacillus cereus* spores on lettuce and carrots. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 367– 372, 2013.

SALUSTIANO, V. C. **Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite**. 2007, 85 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.

SANTORO, D.; GEHR, R.; BARTRAND, T. A.; LIBERTI, L.; NOTARNICOLA, M.; DELL'ERBA, A.; FALSANISI, D.; HAAS, C. N. Wastewater disinfection by peracetic acid: assessment of models, for tracking residual measurements and inactivation. **Water Environment Research**, v. 79, p. 775- 787, 2007.

SANTOS, E.A.J.D.. **Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria com modelos**

matemáticos. Tesis de Doctorado. Universidad Autônoma de Barcelona. p. 220 ,España, 2004.

SAS/STAT Users Guide. Version 9.2. Cary, NC: SWS Institute Inc., 2010.

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

SOUZA, B.I. **Aplicabilidade de um modelo para estimar o crescimento de *Bacillus cereus* em arroz-doce, em função da temperatura. 2003. 71 f.** Tese (Ciência da Nutrição). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

TAUVERON, G., SLOMIANNY, C., HENRY, C., FAILLE, C. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 254 – 262, 2006.

TEIXEIRA, P.; LOPES, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M. J.; Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, v. 22, p. 247- 251, 2005.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarín Journal of Science Technology**, v. 25, p. 807- 815, 2003.

VALCARCE, M. B.; BUSALMEN, S. R.; SÁNCHEZ, S. R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, p. 61 - 66, 2002.

VAN IMPE, J. F. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.97- 105, 2005.

van OSS, C. J., GIESE, R. F. The hidrophilicity and hidrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474 - 477, 1995.

van OSS, C. J. Hydrophobicity and Hydrophilicity of Biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.2, 503 - 512, 1997.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v.74, p. 69 - 117, 1998.

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125 - 148, 1994.

WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. *Bacillus cereus* and *Bacillus Stearotermophilus* spores inactivation in batch and continous flow systems. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 446 - 450, 1995.

WICKRAMANAYAKE, G. B., SPROUL,O.J. Kinetics of the inactivation of Microorganisms. **Disinfection, sterilization and preservation** ,4th ed. Pennsylvania: Lea e Febiger,p. 72 - 84,1991.

WOLF,F.G.; SANTOS,L.O.E.; PHILIPPI,P.C. Formação e dinâmica da interface líquido-vapor simulado pelo método Lattice-Boltzmann. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 28, n.2, p 167-175, 2006.