

ARTIGO

# ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *ESCHERICHIA COLI* EM POLI(TEREFTALATO DE ETILENO) E RESISTÊNCIA A SANIFICANTES

Rech CR\*, Brabes KCS\*\*, Buschinelli de Goes RHT\*\*\*, Aliatti LNS\*\*\*\*, Silva KE\*\*\*\*, Ortolani LG\*\*\*\*\*,  
Negrão FJ\*\*\*\*\*

## Resumo

A compreensão do conceito de biofilmes e de aspectos inerentes a sua estrutura e composição é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias de controle e erradicação de micro-organismos em estado séssil. Assim, o objetivo com este trabalho foi verificar a capacidade de

---

\* Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados; doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Faculdade de Ciências e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados; chaiane.rech@hotmail.com

\*\* Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa; Mestre em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Lavras; Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental na Universidade Federal da Grande Dourados; Rodovia Dourados Itahum, Km 12, Aeroporto, 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil; kellybrabes@ufgd.edu.br

\*\*\* Doutor e Mestre em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa; Professor Associado da Faculdade de Ciências Agrárias e docente do Programa de Pós-Graduação na Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados; rafaelgoes@ufgd.edu.br

\*\*\*\* Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Grande Dourados; Pós-graduanda em Administração Hospitalar pelo Centro Universitário da Grande Dourados; lujansanabria@ufgd.edu.br

\*\*\*\*\* Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Grande Dourados; doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados; kesia\_esther@hotmail.com

\*\*\*\*\* Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Grande Dourados; ortolani.lais@gmail.com

\*\*\*\*\* Doutor e Mestre em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina; Professor Adjunto e docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Faculdade de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados; fabionegrão@ufgd.edu.br

adesão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e de linhagem selvagem na formação de biofilmes em PET. Além disso, descrever e avaliar a eficiência dos sanificantes quaternário de amônia, ácido láctico, digluconato de clorexidina e hipoclorito de sódio na redução microbiana das células em estado aderido e planctônico. Para análise da eficiência dos sanificantes em células planctônicas utilizou-se o método de disco-difusão e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e, para as células aderidas, o teste de CIM. Os resultados obtidos indicaram formação de biofilme pela linhagem padrão ATCC 25922 e isolado selvagem de origem clínica a partir do tempo de 4h. O hipoclorito de sódio não apresentou eficiência na redução populacional de células aderidas e planctônicas em relação aos demais sanificantes testados. O biofilme com isolado selvagem foi sensível a todas as concentrações de quaternário de amônia e inibiu o crescimento até a concentração de 0,002 mg/L no ácido láctico, enquanto para o digluconato de clorexidina apresentou crescimento em todas as concentrações. A *E. coli* ATCC 25922 foi sensível somente às menores concentrações de quaternário de amônia, ácido láctico e digluconato de clorexidina.

Palavras-chave: Biofilme. Sanitizantes. Poli(tereftalato de etileno). *Escherichia coli*.

***Adhesion and formation of Escherichia coli biofilm on poly (ethylene terephthalate) and its resistance to sanitizers***

***Abstract***

*Understanding the concept of biofilms and aspects of its structure and composition is of fundamental importance for the development of new strategies for control and eradication of these micro-organisms in a sessile state. The objective of this work was to verify the ability of adhesion of Escherichia coli ATCC 25922 and of wild lineage in biofilm formation in ethylene terephthalate surface (PET). In addition, to describe and evaluate the efficiency of sanitizers quaternary ammonium, lactic acid, chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite on reducing microbial cells state adhered and planktonic. To analyze the efficiency of sanitizers in planktonic cells we used the method of disk diffusion and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and for adhered cells, only MIC testing. The results showed biofilm formation by standard strain ATCC 25922 and isolated wild from clinical origin, from the time of 4h. The sodium hypochlorite did not show effectiveness in reducing population of planktonic and adhered cells in relation to the other sanitizers tested. The biofilm with wild isolate was sensitive to all concentrations of quaternary ammonium and inhibited the growth up to a concentration of 0,002 mg/L lactic acid, while for chlorhexidine digluconate it showed growth in all concentrations. E. coli ATCC 25922 was sensitive only to the lower concentrations of quaternary ammonium, lactic acid and chlorhexidine digluconate.*

*Keywords: Biofilm. Sanitizers. Ethylene terephthalate. Escherichia coli.*

## 1 INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* faz parte de um grupo de bactérias gram-negativas que pode viver livre no ambiente ou formar biofilme.<sup>1</sup> Biofilmes são células microbianas que se desenvolvem em uma superfície inseridos por uma matriz extracelular<sup>2</sup> e representam risco potencial de contaminação em ambientes de processamento de alimentos.<sup>3</sup>

As células em biofilme são mais resistentes a antimicrobianos, como detergentes e cloro, usados em indústrias de alimentos.<sup>4</sup> Alguns mecanismos são responsáveis por essa resistência, incluindo o uso inadequado ou em excesso de antibióticos e a transmissão de resistência entre os indivíduos em biofilme;<sup>5</sup> a matriz extracelular serve de barreira e impede que o agente tóxico chegue às camadas mais profundas do biofilme.<sup>6</sup> Nas bactérias gram-negativas a resistência está atribuída à membrana externa, capaz de conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação.<sup>7</sup>

Superfícies hidrofóbicas, como os plásticos, facilitam a adesão microbiana comparada a superfícies hidrofílicas.<sup>8</sup> Além disso, as propriedades físico-químicas da superfície podem influenciar tanto na adesão inicial e na resistência dos micro-organismos quanto na sua estrutura e composição.<sup>9</sup>

Por esta razão, um fator preocupante para as indústrias é a higienização dos galões retornáveis de água mineral. Assim, é de grande importância avaliar a eficácia de sanitizantes químicos como antimicrobianos diante da possível formação de biofilme em poli(tereftalato de etileno) (PET), em razão do pH.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS AVALIADOS

Os micro-organismos utilizados foram *E. coli* ATCC 25922, cedida pela Fundação André Tosello, e isolado de *E. coli* selvagem obtido de infecção urinária, cedido pelo Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

### 2.2 SUSPENSÃO BACTERIANA E MEIO DE CULTURA

As estirpes foram inoculadas em Caldo de Infuso de Cérebro e Coração (BHI) a 37 °C por 24 horas. Após o primeiro ciclo de ativação, 1 mL da cultura foi transferido para outro tubo contendo 9 mL de caldo BHI e incubado novamente a 37 °C por 24 horas.<sup>10,11</sup>

## 2.3 PREPARO DOS CUPONS DE POLI(TEREFTALATO DE ETILENO) (PET)

No preparo dos cupons de prova, a garrafa PET comercial serviu de suporte para a indução da adesão das células bacterianas e a formação de biofilme. Os cupons com tamanho aproximado de 1 cm<sup>2</sup> foram cortados e lavados com detergente neutro e água corrente. Após, foram expostos à luz UV no comprimento de onda de 260 nm, por 15 minutos e autoclavados a 121 °C por 15 minutos.<sup>12,13</sup>

## 2.4 ADESÃO DE *E. COLI* NOS CUPONS E ENUMERAÇÃO DAS CÉLULAS PLANCTÔNICAS E ADERIDAS

Os cupons de prova foram imersos em 400 mL de meio de cultura enriquecido (BHI) em concentração dupla, com 10 mL de suspensão bacteriana e incubadas a 37 °C por 256 horas, sem troca do meio de cultura durante o período de incubação.<sup>10,14,15</sup> A avaliação da adesão e formação de biofilme foi realizada nos tempos de contato, sendo: 0, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 32h, 64h, 128h e 256h, totalizando 11 dias, considerando que uma família de três a quatro pessoas utiliza um galão de 20 L no período de 10 a 15 dias.

O tempo 0 (zero) correspondeu à análise logo após a imersão dos cupons de prova no meio de cultura com a suspensão bacteriana, afim de avaliar primeiramente a possível interação do micro-organismo com a superfície.<sup>2,16</sup>

A cada tempo analisado, os cupons foram retirados com o auxílio de uma pinça esterilizada e dispostos em placas de petri esterilizadas e forradas com papel filtro para a retirada do excesso de células planctônicas; em seguida, adicionados em tubos contendo 10 mL de solução tampão fosfato e homogeneizados manualmente durante 15 minutos em vórtex, com a finalidade de remover o biofilme formado para posterior contagem das células viáveis. Foi retirado 1 mL das suspensões bacterianas homogeneizadas para o preparo de diluições seriadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada tamponada com diluição de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>, inoculados as quatro últimas diluições pela técnica de *pour plate* em Agar padrão para contagem (PCA) e incubados a 37 °C por 24 h. Os resultados da contagem de células viáveis foram expressos na unidade de Log UFC/cm<sup>2</sup> de cupom de PET avaliado.<sup>10,15</sup>

A mesma técnica de diluição e contagem de células viáveis foi realizada para a determinação da população planctônica. Todo o procedimento foi realizado em duplicata em três repetições.

## 2.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA A SANIFICANTES

Todas as soluções sanificantes avaliadas foram preparadas a partir do produto comercial concentrado. Utilizou-se o hipoclorito de sódio (HS) Usiquímica®, contendo cerca de 18% de cloro residual total (CRT), calculado após a titulometria iodométrica, e ácido hipocloroso entre 0,012 mg/L e 0,018 mg/L, calculado pela equação de Henderson-Halssselbach (mg/L de HClO = mg/L de cloro resi-

dual livre/ $1+10^{\text{pH-pK}_a}$ ); o quaternário de amônia (QA) Veros® um desinfetante de Cloreto de Benzalcô-nico; o digluconato de clorexidina (DC) 20% Fagron® e o ácido láctico (AL) Mapric®. As concentrações das soluções utilizadas e valores de pH de cada sanificante<sup>17</sup> são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Sanificantes testados em função da concentração e pH

Sanificante		Concentração							
QA	0,048 mg/L	0,024 mg/L	0,012 mg/L	0,006 mg/L	0,003 mg/L	0,0015 mg/L	0,0075 mg/L		
pH	9,60	9,62	10,02	10,25	10,37	10,00	10,22		
AL	0,020 mg/L	0,015 mg/L	0,010 mg/L	0,008 mg/L	0,004 mg/L	0,003 mg/L	0,001 mg/L		
pH	2,25	2,58	3,00	3,12	3,24	3,20	3,62		
DC	0,020 mg/L	0,015 mg/L	0,010 mg/L	0,008 mg/L	0,004 mg/L	0,003 mg/L	0,001 mg/L		
pH	5,45	6,06	6,00	6,37	6,17	6,25	5,24		
HS	500 mg/L	400 mg/L	300 mg/L	250 mg/L	200 mg/L	100 mg/L	50 mg/L		
pH	6,95	7,08	7,02	7,32	7,31	7,11	7,08		

A avaliação do perfil de resistência aos sanificantes foi realizada para as bactérias em estado planctônico e aderido. O perfil antimicrobiano das células planctônicas foi obtido por meio das técnicas de sensibilidade ou susceptibilidade aos antimicrobianos, antibiograma e CIM.

### 2.5.1 Resistência de células planctônicas a sanificantes

Para avaliação do perfil de resistência aos sanificantes por meio do antibiograma, a *Escherichia coli* ATCC 25922 e o isolado clínico selvagem foram reativados em Caldo BHI, dupla concentração e incubados a 37 °C por 24 horas. O inóculo dos tubos foi estriado em placas previamente preparadas de Agar MacConkey. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 horas. Foram selecionadas colônias isoladas características para a realização da coloração Gram. As colônias positivas foram utilizadas para o preparo da suspensão padronizada em escala de MacFarland de, aproximadamente,  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

A CIM para células planctônicas foi adaptada e determinada utilizando-se o método de diluição em caldo, que avalia a eficiência da atividade de um agente antimicrobiano. Para isso, foram utilizadas séries de tubos de ensaio de rosca. No preparo de cada série, composta por nove tubos numerados (1 a 10), foi feita a distribuição de meio de cultura, Caldo BHI em dupla concentração para cada tubo, exceto para o primeiro. Para a obtenção das concentrações de sanificante, a diluição foi realizada a partir do tubo 1 (estoque).<sup>18</sup>

Após a realização da diluição, a suspensão padronizada do inóculo foi adicionada em um volume de 0,1 mL para todos os tubos, exceto para o tubo 9, considerado o controle negativo (BHI + antimicrobiano). O tubo 10 foi considerado o controle positivo (BHI + inóculo). Os tubos foram homogeneizados e incubados a 35 °C por 24 horas.<sup>18</sup>

Foi retirado 1 mL de cada tubo para o preparo de diluições decimais em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada tamponada, inoculados em PCA e incubados a 37 °C por 24 horas.

### 2.5.2 Resistência de células aderidas a sanificantes

O tempo de incubação de 8h foi caracterizado como necessário para a obtenção de um biofilme bacteriano bem estabelecido, em razão das análises dos resultados obtidos da adesão.

A diluição dos sanificantes foi a mesma adotada para células planctônicas. Contudo, em substituição da suspensão bacteriana ajustada para a escala de MacFarland usada como inóculo, os cupons aderidos com o biofilme estabelecido de 8h foram adicionados a 2 mL de caldo BHI, dupla concentração, diluído com os sanificantes e incubados a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, os cupons foram retirados, adicionados a 10 mL de solução tampão fosfato e homogeneizados por agitação em vórtex por 5 minutos. A mesma técnica de diluição e inoculação foi realizada para a obtenção do número de células viáveis.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PLANCTÔNICA E EM BIOFILME

Tanto para células planctônicas quanto para aderidas, observaram-se as fases de desenvolvimento microbiano, diferindo apenas no número de ciclos. Porém, a *E. coli* não apresentou o mesmo perfil de crescimento nas duas condições.

Na Figura 1 observa-se que no tempo inicial de 0h (zero), a *E. coli* ATCC 25922 apresentou 10,04 ciclos Log, e a selvagem, 9,84 ciclos Log, população suficiente para iniciar o processo de adesão. A quantidade de população ativa nos tempos de 8h e 32h de *E. coli* ATCC 25922 foi de 13,94 e 16,38 ciclos Log; para a linhagem selvagem foi de 15,55 e 17,48 ciclos Log.

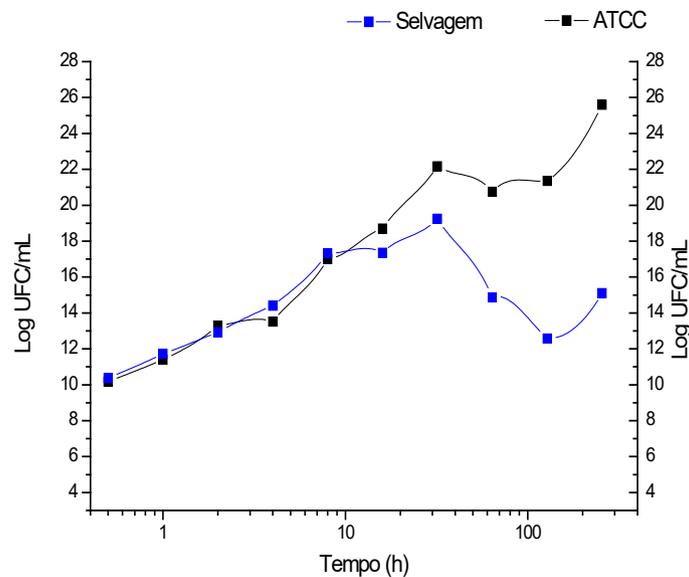


Figura 1 – Avaliação do crescimento bacteriano das células planctônicas em Log UFC/mL de *E. coli* ATCC 25922 e isolado clínico selvagem

Diversos fatores como características de célula microbiana, tipo e propriedades da superfície, presença de matéria orgânica, pH, temperatura do meio no qual o micro-organismo está envolvido, presença e velocidade de fluxo do substrato e propriedades físico-químicas da superfície podem influenciar na adesão em superfícies.<sup>19,20,21</sup>

A adesão bacteriana em função do tempo de contato pode ser observada na Figura 2. A *E. coli* ATCC 25922 iniciou o processo de adesão com uma população de 7,76 Log UFC/cm<sup>2</sup>, ao contrário da *E. coli* de linhagem selvagem, que iniciou com 4,51 Log UFC/cm<sup>2</sup>, porém esta apresentou ciclos de desenvolvimento bacteriano mais definidos, com crescimento em todos os períodos avaliados em relação à população inicial, confirmando que o tempo influencia no aumento populacional de células.

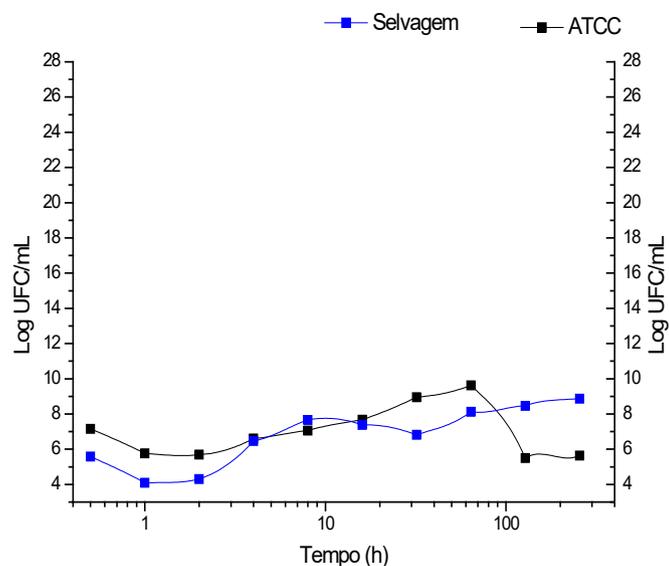


Figura 2 – Avaliação do crescimento bacteriano das células em biofilme em Log UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli* ATCC 25922 e isolado clínico selvagem à superfície de PET

Em estudos realizados por Gândara e Oliveira,<sup>22</sup> o tempo de contato também demonstrou influência sobre a adesão de *Streptococcus thermophilus* na superfície de aço inoxidável. Após três horas, a adesão média foi de  $1,6 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup> e, após seis horas, de  $1,9 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>.

No tempo de 0h até o tempo de 2h, a *E. coli* selvagem teve população inferior a  $10^6$  e  $10^7$  Log UFC/cm<sup>2</sup>, considerando que valores abaixo disso caracterizam apenas uma indicação de formação de biofilme.<sup>23</sup> Contudo, houve interação do micro-organismo com a superfície, pois, nesses tempos, a quantidade de células planctônicas foi suficiente para iniciar a adesão.

A multiplicação microbiana de *E. coli* tem sido observada em diferentes superfícies, como policloreto de vinila, aço inoxidável e polietileno,<sup>24,25,26</sup> em decorrência de que nenhum material é eficaz na prevenção da adesão microbiana e que a característica do material influencia e facilita esse processo.<sup>9,27,28</sup>

A partir dos dados da multiplicação bacteriana apresentados nas Figuras 1 e 2 e, considerando que as bactérias podem aderir a superfícies de PET antes de 24 horas,<sup>29</sup> o tempo de 8h foi escolhido como controle, além de apresentar uma quantidade suficiente de células bacterianas que caracterizam um biofilme estabelecido.

### 3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE PARA CÉLULAS PLANCTÔNICAS

Os resultados do teste de sensibilidade aos sanificantes pelo método de disco difusão foram comparados em relação ao halo de inibição, visto que não há valores de referência que indiquem resistência ou sensibilidade para sanificantes.

De acordo com os dados da Tabela 2, a *E. coli* selvagem foi sensível a todas as concentrações de QA, apresentando halos de inibição entre 10 mm e 13 mm. Quando exposta ao AL, apresentou resistência apenas nas três menores concentrações, enquanto a ATCC 25922 foi resistente apenas às menores concentrações de QA e sensível apenas às maiores concentrações de AL.

Tabela 2 – Perfil antimicrobiano de *E. coli* ATCC 25922 e isolado clínico selvagem planctônicas em função da ação de sanificantes pelo método de disco-difusão

Sanificantes	Concentração (mg/L)	Halo de Inibição Selvagem (mm)	Halo de Inibição ATCC 25922 (mm)
Quaternário de Amônia	0,048	13	28
	0,024	12	20
	0,012	12	10
	0,006	12	12
	0,003	12	10
	0,0015	10	--
	0,00075	10	--
	0,020	14	22
	0,010	12	14
	0,005	10	--
Ácido Lático	0,0025	10	--
	0,002	--	--
	0,001	--	--
	0,0005	--	--
	0,020	20	16
	0,015	18	16
	0,010	14	14
	0,008	14	14
	0,004	14	14
	0,003	12	14
Hipoclorito de Sódio	0,001	10	14
	500	--	--
	400	--	--
	300	--	--
	250	--	--
	200	--	--
	100	--	--
	50	--	--

Apesar de a *E. coli* apresentar sensibilidade a todas as concentrações de DC testadas nas duas condições, a ATCC 25922 foi mais resistente, com halos de inibição menores que a selvagem. O HS não foi eficaz para nenhuma delas tanto no antibiograma quanto no CIM.

Para as células planctônicas o QA e o DC foram mais eficientes apresentando halos de inibição maiores e em todas as concentrações.

De acordo com os dados na Tabela 3, para a CIM, os sanificantes QA e AL apresentaram eficiência em células planctônicas de *E. coli* ATCC 25922 na concentração de 0,012 mg/L e 0,0025 mg/L, respectivamente. Enquanto para a selvagem, a CIM de QA foi de 0,006 mg/L e 0,001 mg/L para AL, demonstrando ser mais sensível que a ATCC 25922.

Tabela 3 – Perfil antimicrobiano da concentração inibitória mínima (CIM) de *E. coli* ATCC 25922 e isolado clínico selvagem planctônica exposta a sanificantes

Sanificante	Células Planctônicas	
	Selvagem Concentração (mg/L)	ATCC 25922 Concentração (mg/L)
Quaternário de Amônia	0,006	0,012
Ácido Lático	0,001	0,0025
Digluconato de Clorexidina	0,015	0,003
Hipoclorito de Sódio	--	400

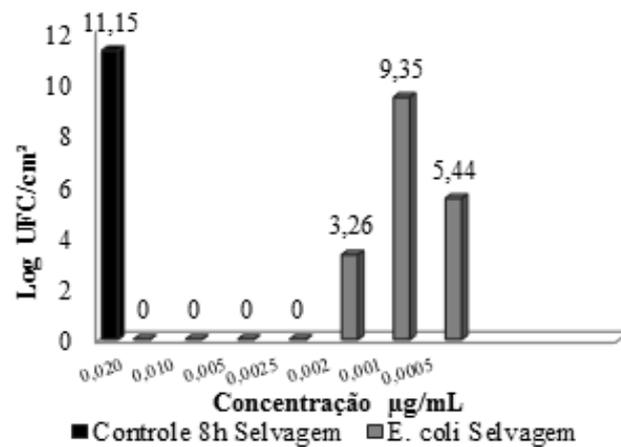
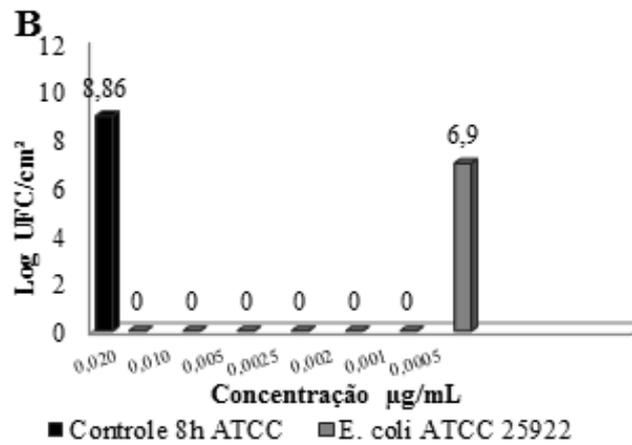
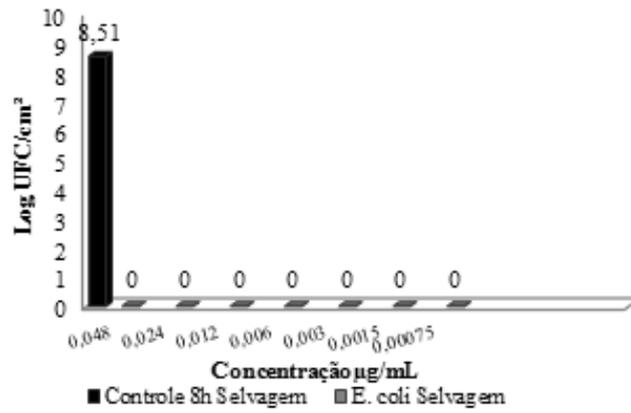
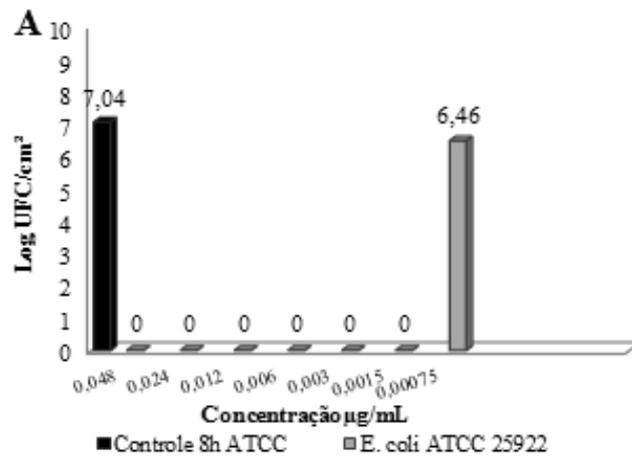
Quando exposta ao DC, a selvagem foi mais resistente, apresentando inibição de crescimento a partir da concentração de 0,015 mg/L enquanto a ATCC 25922 foi resistente apenas à menor concentração de 0,001 mg/L. Da mesma forma, a selvagem apresentou maior resistência após tratamento com HS, no qual não apresentou redução em nenhuma das concentrações testadas na CIM. No antibiograma, nenhuma condição apresentou halo de inibição.

### 3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE PARA CÉLULAS EM BIOFILME

Alguns estudos têm enfatizado a formação de biofilme em superfícies, enquanto outros, uma maneira de penetrar nas camadas de biofilme com o intuito de eliminá-los.<sup>30</sup> Para isso, estudos relacionados à utilização de agentes antimicrobianos, como os sanificantes, têm sido realizados.

Ao avaliar visualmente a CIM de células em biofilme, em todas as concentrações houve turbidez do meio, indicando uma possível multiplicação bacteriana. Dessa forma, para se avaliar a presença de células viáveis, foi utilizada a técnica de *pour plate* em PCA para confirmação da multiplicação bacteriana ou a presença de resíduos de material celular.

A Figura 3 apresenta a resistência dos micro-organismos em biofilme expostos aos sanificantes. A *E. coli* ATCC 25922, quando exposta ao QA, demonstrou menor resistência, pois apresentou crescimento em menor concentração do sanificante. O isolado clínico selvagem não apresentou crescimento em nenhuma das concentrações testadas, confirmando a ação antimicrobiana do QA, como lise celular, morte microbiana, desnaturação de proteínas, ruptura da permeabilidade e redução da absorção de nutrientes.<sup>31,32,33</sup>



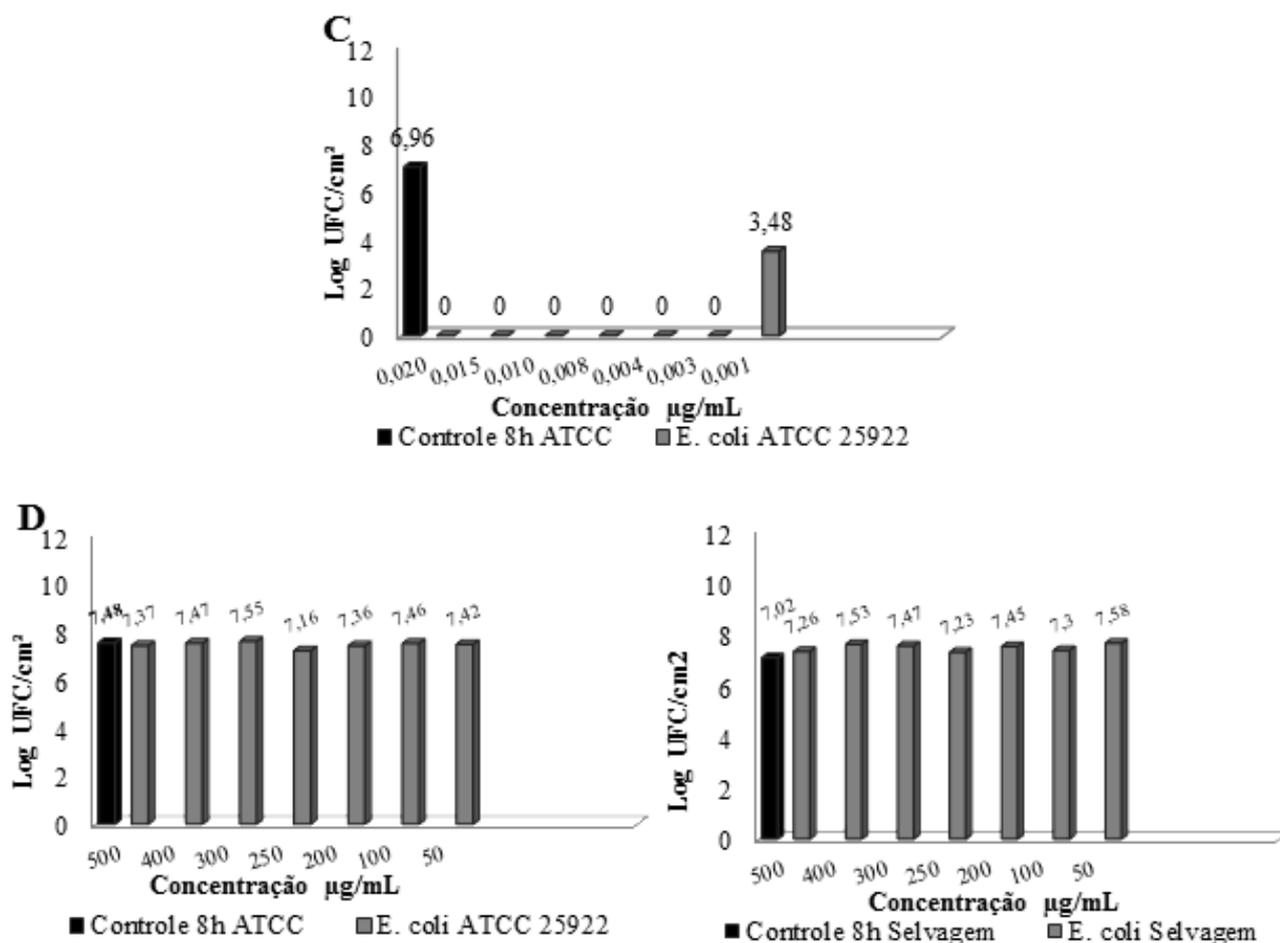


Figura 3 – Contagem de células do biofilme em Log UFC/cm<sup>2</sup> comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 8h de *E. coli* ATCC 25922 e isolado clínico selvagem após a exposição aos sanificantes (A) Quaternário de Amônia (B) Ácido Lático (C) Digluconato de Clorexidina (D) Hipoclorito de Sódio

Observa-se que o QA foi efetivo para as células planctônicas e aderidas tanto para a ATCC 25922 quanto para a linhagem selvagem, pois não foi possível identificar crescimento microbiano da *E. coli* selvagem e, apenas nas menores concentrações, houve crescimento de ATCC 25922. Frank e Chmielewski<sup>34</sup> avaliaram a eficiência do mesmo sanificante e verificaram redução populacional de *Staphylococcus aureus* aderido em diversas superfícies utilizadas na indústria de alimentos. Em outro estudo,<sup>35</sup> o biofilme de *E. coli* ATCC 25922 apresentou valores menores em relação ao controle após tratamento com quaternário de amônia.

Quando exposta ao AL, a ATCC 25922 apresentou menor resistência que a selvagem. O crescimento foi inibido até a concentração de 0,001 mg/L na ATCC 25922 e 0,002 mg/L na selvagem em relação ao biofilme controle de 8h, apresentando uma redução de população nas menores concentrações do sanificante. Entre os diversos sanificantes químicos estudados, o AL tem demonstrado eficiência na redução de células de *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* aderidas em PVC e aço inoxidável<sup>24</sup> e em biofilmes de duas espécies de *Enterococcus*.<sup>36</sup>

O perfil de resistência da *E. coli* ATCC 25922, quando exposta ao DC, apresentou crescimento apenas na menor concentração testada, diferente para a selvagem, na qual houve apenas redução da população bacteriana, sugerindo que o biofilme atua como uma barreira de proteção, fornecida pelo EPS. O mecanismo de ação do DC como antibacteriano envolve a adsorção da membrana celular por interações eletrostáticas da mesma forma que o QA.<sup>37</sup>

Bonez *et al.*<sup>38</sup> avaliaram a atividade do DC em biofilmes de algumas bactérias e fungos e verificaram menor eficiência para *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, os quais apresentaram maior resistência ao sanificante.

A *E. coli* ATCC 25922, em contato com o HS, apresentou uma pequena redução da população em todas as concentrações exceto a de 300 mg/L, apresentando resistência a uma quantidade maior de população bacteriana presente na alíquota, em relação à quantidade de sanificante contido na diluição. Para a selvagem, o sanificante não foi eficiente, apresentando aumento considerável da população em todas as concentrações comparadas com o controle.

A presença de matéria orgânica na matriz extracelular pode ser responsável pela ineficiência do HS, visto que, na presença de matéria orgânica, o cloro livre é transformado em formas de cloro combinado, diminuindo sua ação e resultando em baixa inativação dos micro-organismos.<sup>39</sup> Além disso, estudo realizado por Dukan e Touati<sup>40</sup> caracterizou a presença de genes responsáveis pela resistência de *E. coli* ao peróxido de hidrogênio, indicando que os mesmos genes também podem causar resistência ao ácido hipocloroso.

#### 4 CONCLUSÃO

Neste estudo, a *E. coli*, nas duas condições testadas, apresentou capacidade de adesão a superfícies de PET. Quando expostas a sanificantes, a *E. coli* de linhagem selvagem e ATCC 25922 em condição de biofilme apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Esse fato representa um problema para as indústrias de alimentos, pois o biofilme pode ser fonte de contaminação e afetar a qualidade dos alimentos.

Dos sanificantes testados, o hipoclorito de sódio não apresentou eficiência, visto que não inibiu a multiplicação microbiana. Enquanto o QA e o AL foram eficientes para as duas condições, pois, quando apresentou crescimento, foi apenas nas menores concentrações, diferente do digluconato de clorexidina, que foi eficaz apenas para *E. coli* ATCC 25922.

#### REFERÊNCIAS

1. Tschowri N, Lindenberg S, Hengge R. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2012 Sept; 85(5): 893-906. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08147.x.

2. Donlan RM. Biofilm: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sept; 8(9): 881-90. doi: 10.3201/eid0809.020063.
3. Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 2004 May; 38(5): 428-32. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x
4. Watnick P, Kolter R. Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol.* 2000 May; 182(10): 2675-79. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000
5. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microb Drug Resist.* 2013 Aug; 19(4): 256-65. doi: 10.1089/mdr.2012.0244
6. Królasik J, Zakowska Z, Krepska M, Klimek L. Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. *Pol J Microbiol.* 2010; 59(4): 281-7.
7. Boari CA, Alves, MP, Tebaldi VMR, Savian TV, Piccoli, RH. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2009; 29(4): 886-95.
8. Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhado G, *et al.* Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola. *Acta Sci Vet.* 2009; 37(3): 225-30.
9. Gharechahi M, Moosavi H, Forghani M. Effect of surface roughness and materials composition on biofilm formation. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2012 Oct; 3(4): 541-6. doi: 10.4236/jbnb.2012.324056
10. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 1999; 284(5418): 1318-22.
11. Lee MY, Ko KS, Song JH, Peck KR. In vitro effectiveness of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections by *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Aug; 60(4): 782-7. doi: 10.1093/jac/dkm295
12. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment infectious diseases. *Nat Rev Microbiol,* 2004; 2(2): 95-108. doi: 10.1038/nrmicro821

13. Parizzi SQF, Andrade NJ, Silva, CAS, Soares NFF, Silva, EAM. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz Arch Biol Technol.* 2004; 47(1): 77-83. doi: 10.1590/S1516-89132004000100011
14. Percival SL, Malic S, Cruz H, Williams D. *Introduction to Biofilms.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011; 6: 41-68. doi: 10.1007/978-3-642-21289-5\_2
15. Zobell C. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 1943; 46(1): 39-56.
16. Characklis W. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res* 1973; 7(9): 1249-58.
17. Andrade NJ, Macêdo JAB. *Higienização na indústria de alimentos.* São Paulo: Varela; 1996.
18. Rossi ACR. Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto de quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios [dissertação]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2008.
19. Pompermayer DMC, Gaylarde CC. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol.* 2000; 17(4): 361-5.
20. Oulahal N, Brice W, Martial A, Degraeve P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control.* 2008; 19(2): 178-85.
21. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
22. Gândara ALN, Oliveira JS. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2000; 20(1): 1-7.
23. Zottola EA, Sasahara KC. Microbial biofilms in the food processing. Should they be a concern? *Int J Food Microbiol.* 1994; 23:125-48.

24. Ban GH, Park SH, Kim SO, Ryu S, Kang DH. Synergistic effect of steam and lactic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. *Int J Food Microbiol.* 2012; 157(2): 218-23. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.006
25. Ryu JH, Beuchat LR. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to Chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(1): 247-54.
26. Terada A, Okyama K, Nishikawa M, Tsuneda S, Hosomi M. The effect of surface charge property on *Escherichia coli* initial adhesion and subsequent biofilm formation. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109(7): 1745-54. doi: 10.1002/bit.24429
27. Tunney MM, Jones DS, Gorman SP. Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. *Methods Enzymol.* 1999; 310: 558-66.
28. Donlan RM. Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(2): 277-81. doi: [10.3201/eid0702.700277](https://doi.org/10.3201/eid0702.700277)
29. Le Magrex-Debar E, Lemoine J, Gellé, MP, Jacquelin LF, Choisy C. Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int J Food Microbiol.* 2000; 55(1-3): 239-43.
30. Abushelaibi AA, Al Shamsi MS, Afifi HS. Use of antimicrobial agents in food processing systems. *Food Nutr Agric.* 2012; 4(1): 2-7.
31. Simões M, Simões LC, Cleto S, Pereira MO, Vieira MJ. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. *Int J Food Microbiol.* 2008; 121(3): 335-41. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.041](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.041)
32. Mc Donnell G, Russel AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(1): 147-79.
33. Cloete TE, Jacobs L, Brözel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 1998; 9(23): 23-37. doi: 10.1023/a:1008216209206
34. Frank JF, Chmielewski RAN. Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. *J Food Prot.* 1997; 60(1): 1-6.

35. Cabeça TK, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. (2006). Activity of disinfectants against foodborne pathogens in suspension and adhered to stainless steel surfaces. *Braz J Microbiol.* 2012; 43(3): 1112-9. doi: 10.1590/S1517-83822012000300038
36. Arias-Moliz MT, Baca P, Ordóñez-Becerra S, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(5): 902-6.
37. Zanatta FB, Rösing CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A* 2007; 1(2): 35-43.
38. Bonez PC, Santos Alves CF, Dalmolin TV, Agertt VA, Mizdal CR, Flores VC et al. Chlorhedine activity against bacterial biofilms. *Am J Infect Control.* 2013; 41(12): 119-22. doi: 10.1016/j.ajic.2013.05.002
39. Souza JB, Daniel LA. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. *Eng sanit ambient.* 2005; 10(2): 111-7. doi: 10.1590/S1413-41522005000200004
40. Dukan S, Touati D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA, damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol.* 1996; 178(21): 6145-50.

Data da submissão: 09 de dezembro de 2016

Avaliado em: 13 de dezembro de 2016 (AVALIADOR A)

Avaliado em: 13 de dezembro de 2016 (AVALIADOR B)

Aceito em: 14 de dezembro de 2016

