

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SANITIZAÇÃO A SECO NO CONTROLE DE *Cronobacter sakazakii*

Palavras-Chave: CRONOBACTER, BIOFILME, SANITIZAÇÃO

Autoras:

JULIA CONTI FELIX, FEA - UNICAMP

ERIKA SANTIAGO DA SILVA, FEA - UNICAMP

Prof^(a). Dr^a MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO, ORIENTADORA, FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Cronobacter sakazakii, é uma bactéria Gram-negativa, facultativamente anaeróbica e patogênica. Ela é comumente encontrada em alimentos de baixa umidade (LMF), incluindo leite em pó, farinha e cereais. Tem sido associada a casos de meningite neonatal decorrentes da contaminação de fórmulas infantil em pó (PIF, NA LING et al, 2020).

Os LMF podem ser contaminados em qualquer etapa da cadeia produtiva de alimentos. De acordo com o Código de Práticas de Higiene do *Codex Alimentarius* (2015), as áreas de processamento seco devem ser projetadas para excluir a umidade do ambiente na medida do possível, a fim de prevenir o crescimento microbiano e minimizar a probabilidade de um patógeno se estabelecer no ambiente fabril, formando biofilme.

Geralmente, qualquer superfície é vulnerável ao desenvolvimento de biofilmes, incluindo plástico, vidro, metal, madeira e produtos alimentícios (SREY et al., 2013). A presença de resíduos orgânicos e/ou inorgânicos pode resultar na formação de uma camada condicionante sobre as superfícies de contato (TANG et al., 2009). O condicionamento altera as propriedades físico-químicas da superfície, influenciando a taxa e a extensão da fixação microbiana, além de afetar a ordem dos eventos de adesão e formação de biofilme (SIMÕES et al., 2010). O *Codex Alimentarius* (2015) recomenda preferencialmente o emprego de métodos de higienização a seco em indústrias de LMF, envolvendo o uso de calor seco ou produtos com secagem rápida, como o álcool 70%. O tratamento com luz UV também vem sendo estudado e usado para desinfecção de água, superfícies e produtos alimentícios (VASELIEV et al., 2018)

Portanto, com base no conhecimento sobre a atuação de *C. sakazakii* como agente etiológico de doenças de origem alimentar e no risco que este representa para as indústrias de LMF, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de álcool 70% e da luz UV-C no controle de *C. sakazakii* aderido em superfícies de aço inoxidável e polipropileno.

METODOLOGIA:

A análise de adesão a seco de *Cronobacter sakazakii* em superfícies de aço inoxidável (AI) e de polipropileno (PP) foi conduzida utilizando metodologia adaptada de Hildebrandt et al. (2017). Para a preparação do inóculo, foram utilizadas cinco cepas isoladas de matrizes secas, fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Uma alíquota de cada cepa foi estriada em placa de ágar Trypticase de Soja (TSA, Difco, USA) e incubada a 37 °C por 24 h. Posteriormente, as células foram removidas do ágar por adição de 4,5 mL de solução salina a 0,85%, formando uma suspensão de células.

Para a inoculação a seco, 30 g de pérolas de vidro foram cobertas com o *pool* das 5 cepas. Após 2 min de contato, o excesso do inóculo foi descartado e as pérolas foram levadas ao fluxo laminar por 40 min para completa secagem. Em seguida, as pérolas secas foram transferidas para um frasco contendo 10 g de terra estéril e submetidas à agitação a 300 rpm por 7 min. Após a remoção das pérolas, a terra inoculada foi transferida para frascos contendo cupons de AI e PP, que foram incubados a 37 °C. As contagens de células aderidas foram realizadas imediatamente após o procedimento e após 2, 5 e 7 dias de incubação, com monitoramento da atividade de água (a_w) do veículo.

A contagem das células aderidas aos cupons foi realizada conforme a metodologia de Sharma et al. (2005). Após cada período de incubação, os cupons foram lavados em 10 mL de solução salina a 0,85% por 30 s de contato para remoção das células planctônicas (CP). Em seguida, foram transferidos para um tubo contendo 5 mL de solução salina a 0,85% com 10 pérolas de vidro e agitados em vórtex por 1 min para remoção das células sésseis (CS). As diluições seriadas das suspensões resultantes foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 h e seus resultados expressos em log UFC/cm², já a contagem no veículo foi determinada através de diluições seriadas e plaqueamento TSA a 37 °C e seus resultados expressos em log UFC/g.

O procedimento de higienização a seco foi realizado utilizando UV-C e álcool 70%. Para o método UV-C, adaptado de Sommers et al. (2010), os cupons foram dispostos em placas de Petri e expostos à luz UV-C a uma distância máxima de 15 cm da lâmpada, por 0, 5, 7, 10 e 15 min. No tratamento com álcool 70%, foi depositada uma solução de álcool etílico a 70% sobre os cupons de AI e PP. Após cada tempo de exposição (0, 1, 2, 3 e 5 min), foi aplicado um neutralizante (Caldo Lethen suplementado com Tween 80) para inibir a ação do álcool 70%.

Foram realizadas três repetições de cada experimento, e a determinação do número de células após cada tratamento foi realizada conforme os procedimentos descritos anteriormente. Os dados foram analisados pelo software estatístico SAS, utilizando ANOVA e o teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No geral, o tempo de contato entre o veículo inoculante e as superfícies não apresentou influência significativa ($p > 0,05$) sobre a contagem do patógeno, com exceção das células planctônicas em cupons de PP. As maiores taxas de adesão (CS) foram obtidas para PP, variando de 3,15 log no dia da inoculação a 2,51 log no último dia de contagem (**Figura 1**). Não houve variação significativa da a_w das amostras ($p > 0,05$) para ambas as superfícies (dados não mostrados).

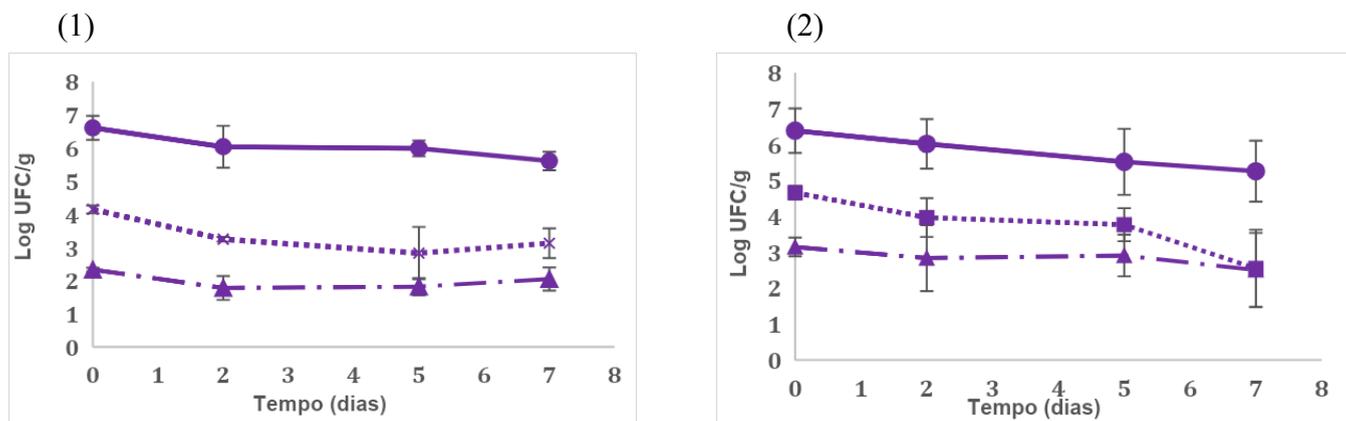


Figura 1. Contagem de *Cronobacter* em AI (1) e PP (2), utilizando terra como veículo de inoculação a seco. Amostras armazenadas a 37 °C por até 7 dias. (-) veículo; (···) células planctônicas; (- · -) células sésseis.

Para o tratamento com álcool 70%, as contagens de CP no tempo zero variaram entre 3,49 log UFC/cm² (AI) e 3,74 log UFC/cm² (PP). As CPs foram reduzidas abaixo do limite de detecção (<1,00 log UFC/cm²) após 1 min de tratamento em AI e 2 min em PP. Todavia, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tipos de superfície. Com relação às CSs, tanto nas superfícies de AI quanto nas de PP tratadas com álcool 70%, as contagens ficaram abaixo do limite de detecção (<0,70 logUFC/cm²) após 1 min de tratamento, correspondendo a reduções de 0,88 log e 1,53 log, respectivamente (**Figura 2**). Não houve influência significativa ($p > 0,05$) do tipo de superfície na ação de álcool 70% sobre CS.

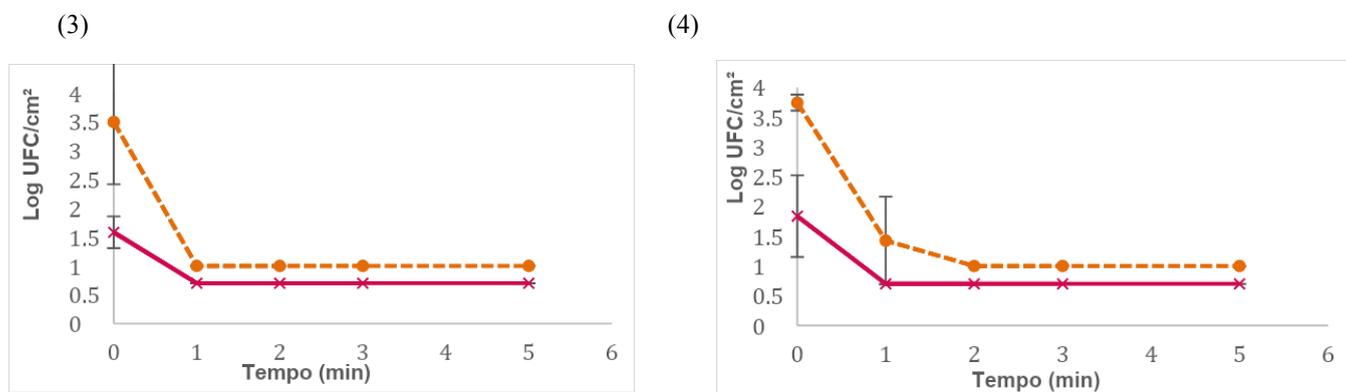


Figura 2. Contagem de *Cronobacter* em AI com sanitização de álcool 70% (3), PP com sanitização de álcool 70% (4). Amostras armazenadas a 25 °C por 2 dias. (···) células planctônicas; (-) células sésseis.

Para o tratamento com luz UV-C, as contagens de CP no tempo zero variaram entre 3,04 log UFC/cm² (AI) e 3,33 log UFC/cm² (PP). Foram necessários 7 e 10 min de exposição à luz UV-C para PP e AI, respectivamente, para atingir o limite de detecção (<1 log UFC/cm²) (**Figura 3**). Já a contagem inicial de células sésseis (CS) foi de 3,82 log para AI e 2,70 log para PP ($p < 0,05$). Todavia, apesar da diferença de adesão inicial, ambas as superfícies apresetaram CS abaixo do limite de detecção (<0,70 log UFC/cm²) a partir de 5 min de tratamento. Não houve influência significativa ($p > 0,05$) do tipo de superfície sobre o desempenho da luz UV-C.

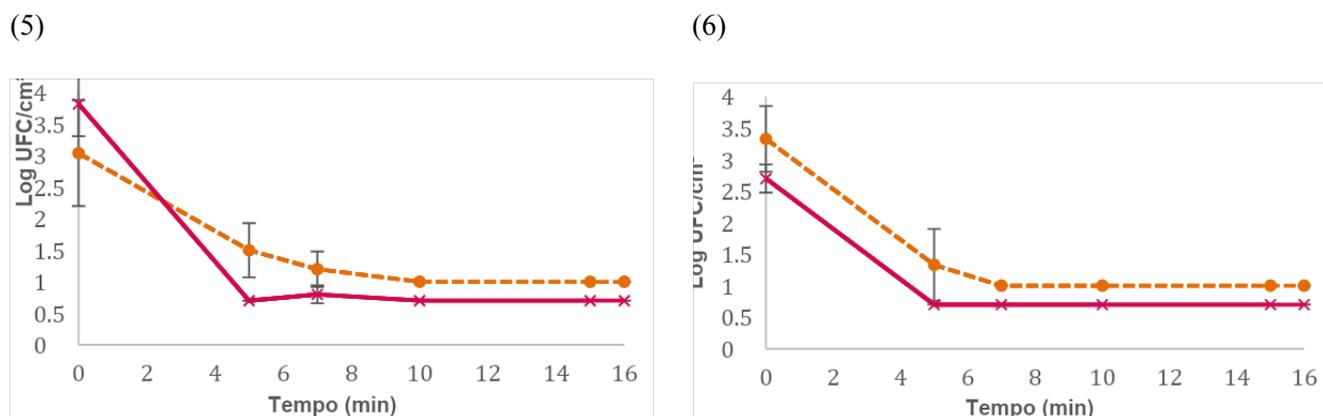


Figura 3. Contagem de *Cronobacter* em AI com sanitização de luz UV-C (5), PP com sanitização de luz UV-C (6). Amostras armazenadas a 25 °C por 2 dias. (···) células planctônicas; (-) células sésseis.

Nossos dados corroboram com os achados de Pei e Xiaoyan (2019) que avaliou o efeito de UV e álcool 70% sobre biofilmes de *Cronobacter* em silicone, policarbonato e aço inoxidável. Os autores observaram reduções abaixo do limite de detecção (<1,18 log UFC por cupom) após 5 min utilizando álcool 70% e 30 min de exposição à luz UV a 2.160 mW.s/cm².

CONCLUSÕES:

Dada a elevada resistência dos biofilmes de *C. sakazakii*, é crucial implementar métodos de sanitização eficazes na indústria de LMF. Os resultados demonstraram maior eficácia do álcool 70% em comparação à luz UV-C na eliminação da carga microbiana desse microrganismo. Ademais, o tipo de superfície não influenciou significativamente ($p > 0,05$) o desempenho de ambos os sanitizantes.

BIBLIOGRAFIA

- Codex Alimentarius Commission. **Code of Hygienic Practice for Low-Moisture Foods**. 75-2015, 2015.
- Hildebrandt, I. et al. Dry transfer inoculation of low-moisture spices containing antimicrobial compounds. **Journal Food Protection**. 80.338–344. 2017.
- Na Ling et al. Insights into *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation and Control Strategies in the Food Industry. **Engineering**. 6.393-405.2020.

- Pei, X., et al. Surveillance and characterisation of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories. **Food Control**.96. 318-323. 2019.
- Sharma, M. et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. **Journal of applied microbiology**. 99. 449-59. 2005
- Simões, M. et al. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**. 573-583. 2010.
- Sommers, C. et al. Ultraviolet light (254 NM) inactivation of pathogens on foods and stainless steel surfaces. **Journal of Food Safety**. 30. 470 - 479. 2010.
- Srey, S. et al. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**. 31. 572-585. 2013.
- Strysko, J. et al. Food Safety and Invasive *Cronobacter* Infections during Early Infancy, 1961-2018. **Emerging infectious diseases**. 26. 2020.
- Tang, X. et al. Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**. 36. 2009.
- Vasiliev, A. et al. UV disinfection technologies for water, air and surface treatment. **Light & Engineering**. 26.25-31.2018