

# AÇÃO DE SANITIZANTES EM BIOFILMES FORMADOS POR CEPAS DE *Salmonella* MULTIRRESISTENTES (MDR)

**Palavras-Chave: SANITIZANTES, MULTIRRESISTÊNCIA, BIOFILME**

**Autores(as):**

**LUIZA BEATRIZ IEKS TEIXEIRA, FEA – UNICAMP**

**FRANCISCA AIRLANE ESTEVES DE BRITO, FEA – UNICAMP**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO (ORIENTADORA), FEA - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

O uso indiscriminado de antibióticos para tratamento de infecções e proteção da saúde humana e animal tem levado à resistência antimicrobiana (AMR) (OIE, 2016). Bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* são consideradas importantes agentes causadores de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHAs). No Brasil, no período de 2007 a 2019, dos 3.275 surtos de DTHA com agente etiológico identificado, cerca de 920 foram atribuídos a *Salmonella* (BRASIL, 2021). No entanto, além da virulência e patogenicidade, estes microrganismos possuem ampla resistência microbiana.

Um microrganismo resistente a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos é definido como multirresistente (MDR) (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). Infecções causadas por patógenos MDR possuem maior complexidade em seu tratamento, com maiores custos terapêuticos e elevadas taxas de letalidade (BRITO *et al.*, 2022; WHO, 2020)

Biofilmes são comunidades complexas, formadas por uma ou mais espécies de microrganismos, imersas em uma matriz extracelular (EPS) (GALIÉ *et al.*, 2018). Estas estruturas são um grande problema à indústria de alimentos, pois podem colonizar diferentes superfícies de contato e permanecer ativas por bastante tempo, levando à contínua contaminação de inúmeros lotes de alimentos processados (MØRETRO *et al.*, 2012). A maioria dos sanitizantes utilizados na indústria de alimentos são eficientes contra células planctônicas de *Salmonella*. No entanto, quando se trata de biofilmes, os efeitos destes compostos podem ser relativamente diminuídos, cerca de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos sanitizantes (ALONSO *et al.*, 2022; MØRETRO *et al.*, 2012)

Sanitizantes como hipoclorito de sódio, compostos quaternários de amônio e ácido peracético são os mais utilizados na indústria de alimentos e foram amplamente avaliados contra patógenos de origem alimentar (ANDRADE *et al.*, 2008). No entanto, poucos trabalhos relacionam o efeito destes sanitizantes em biofilmes formados por cepas de *Salmonella* MDR. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da multiresistência a antimicrobianos (MDR) frente a ação de sanitizantes à base

de cloro, quaternário de amônio e ácido peracético nos tempos (0, 5, 10, 15 e 30) min em biofilmes formados por cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos, humanos e animais

## **METODOLOGIA:**

### **Origem dos isolados**

Para realização dos experimentos foram utilizadas 10 cepas de *Salmonella*: 5 cepas sensíveis e 5 cepas multirresistentes a antimicrobianos, isoladas de alimentos, humanos e animais. As cepas foram armazenadas em biofreezer a - 80°C, em Caldo Trypticase de Soja (TSB, Difco, MD, EUA) suplementado com 3,5% de glicerol (v/v). Para a reativação de cada cepa, uma pérola de vidro foi transferida para um tubo contendo 5 ml de caldo BHI (Difco) e incubada a 37°C por 20 h. Após este período, uma alçada foi estriada em Ágar Trypticase de Soja (TSA, Difco, MD, EUA) inclinado e incubado a 37°C por 20 h. As cepas foram mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento do uso.

### **Formação de biofilme e avaliação da capacidade de resistência a sanitizantes**

Os biofilmes foram formados pelo método de cristal violeta, utilizando microplacas de polipropileno de fundo chato com 96 poços, conforme Stepanović *et al.* (2003). Em cada poço foram adicionados 180 µl de TSB e mais 20 µl do inóculo ( $10^6$  UFC/ml) contendo cada uma das cepas de *Salmonella*. Como controle negativo (branco) de cada teste, foram utilizados poços não inoculados nas mesmas condições. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após incubação e formação dos biofilmes, o conteúdo dos poços foi removido. Cada poço foi lavado com 200 µL de solução tampão fosfato estéril (PBS - pH 7,2). Posteriormente, os sanitizantes foram aplicados aos poços e permaneceram em contato com o biofilme por 0, 5, 10, 15 e 30 min. Após cada tempo de contato, os agentes foram removidos e os poços lavados com as soluções neutralizantes e, em seguida, com PBS. As células do biofilme foram suspensas por pipetagem. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas e determinação da contagem de *Salmonella*. O plaqueamento foi realizado após cada intervalo de tempo definido (0, 5, 10, 15 e 30 min) por microgotas em TSA, com posterior incubação a 37 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em  $\log_{10}$  de Unidade Formadora de Colônia por mililitro (log UFC/ml) e o experimento realizado em três ensaios independentes para cada sanitizante (CRUZ E TAMMELA, 2018; PITTS *et al.* 2003). As contagens foram expressas em reduções e estão representadas pela equação (1), abaixo:

Log reduções (N/N0) (Eq.1).

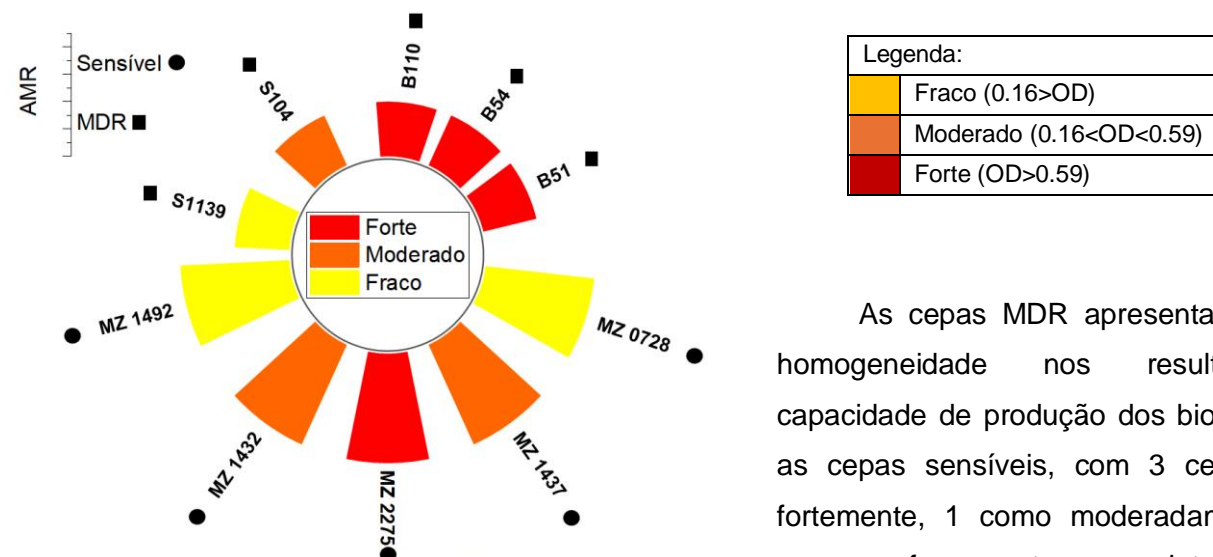
Onde N é a contagem após ação do sanitizante e, N0, é a contagem inicial.

### **Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram analisados através de ANOVA e teste de Tukey para determinação de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos avaliados, utilizando-se o Software Statistica Software (versão 10.0, StatSoft, CA, EUA). Os gráficos foram criados utilizando o Data Analysis and Graphing Software OriginPro® 2024.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

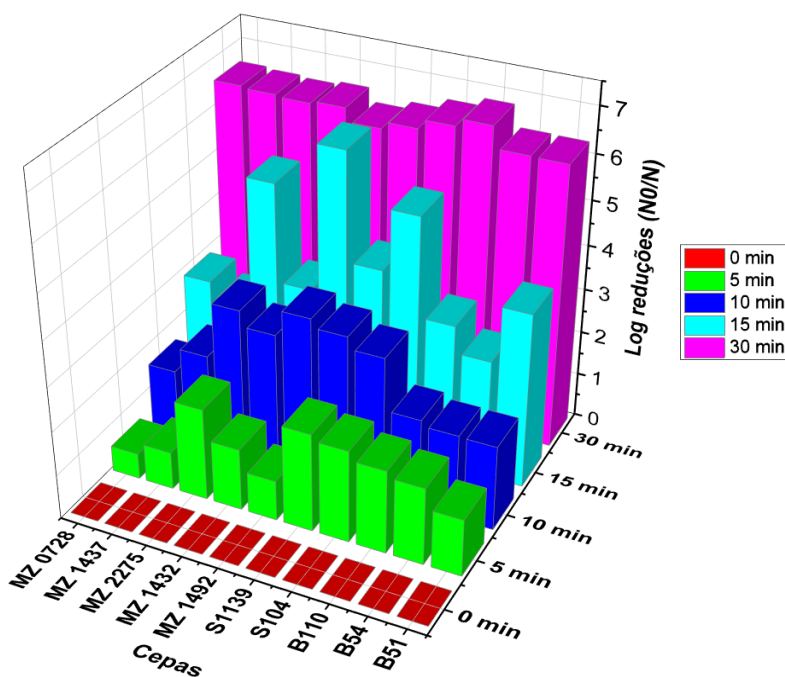
As cepas foram classificadas quanto a capacidade de produção dos biofilmes como fraca, moderada ou forte produtoras (Cusumano *et al.*, 2019). Os resultados estão representados na Figura 1 e relacionam também o perfil de resistência antimicrobiana.



**Figura 1.** Biofilmes produzidos por cepas de *Salmonella* MDR e sensíveis a antibióticos

As cepas MDR apresentaram maior homogeneidade nos resultados e capacidade de produção dos biofilmes que as cepas sensíveis, com 3 cepas como fortemente, 1 como moderadamente e 1 como fracamente produtora. Em contrapartida, as cepas sensíveis apresentaram maior quantidade de cepas

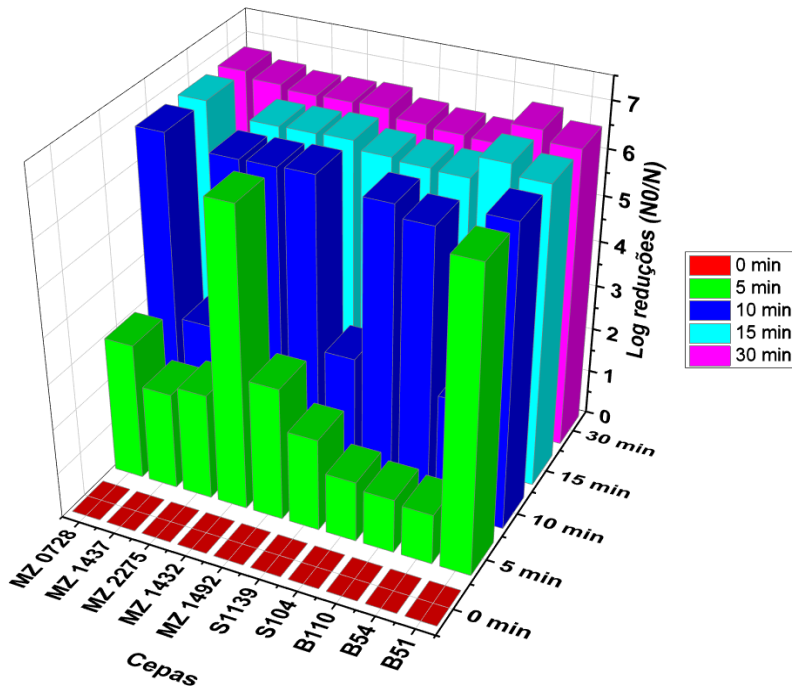
fraca ou moderadamente produtoras de biofilme. A classificação dos biofilmes foi necessária para avaliação da ação dos sanitizantes.



**Figura 2.** Reduções das contagens de *Salmonella* exposta a hipoclorito de sódio por até 30 min.

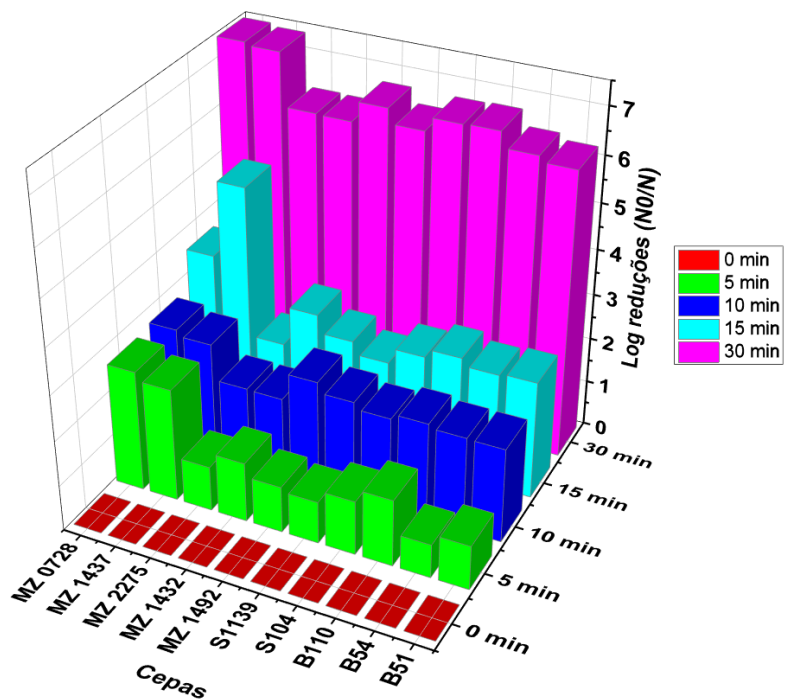
No caso da exposição ao hipoclorito de sódio (Figura 2), é possível observar que em 10 min, as reduções variaram de 1.6 a 3.7 log UFC/ml. Após 15 min de exposição ao sanitizante, apenas três cepas foram reduzidas em cerca de 5 logs - S104 (MDR), MZ1492 (S) e MZ2275 (S) – produtoras de biofilme moderado, fraco e forte, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, observa-se que B54 (MDR), MZ1437 (S) e MZ0728 (S) foram as mais resistentes a ação do de 2.7, 2.6 e 2.9 log UFC/ml, respectivamente, após 15 min. Estas

cepas apresentaram forte, moderada e fraca adesão de biofilme. Em 30 min, todas as cepas avaliadas atingiram redução de aproximadamente 6 log UFC/ml.



**Figura 3.** Reduções das contagens de *Salmonella* exposta a ácido peracético por até 30 min.

Quanto ao quaternário de amônio (Figura 4), pode-se notar que, com 5 min de exposição, MZ1437 (S, moderadamente produtora) e MZ0728 (S, fracamente produtora) apresentaram as maiores reduções ( $\approx 2$  logs) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os tempos de tratamento 10 min e 15 min ( $p > 0,05$ ), exceto para MZ1437 (S, moderadamente produtora). Após 30 min, todas as cepas atingiram o limite de detecção.



**Figura 4.** Reduções das contagens de *Salmonella* exposta a quaternário de amônio por até 30 min.

De modo geral, B54 (MDR, forte adesão) e S1139 (MDR, fraca adesão) mostraram-se mais resistentes à ação dos sanitizantes. Por outro lado, S104 (MDR, moderado) e MZ1492 (S, moderado) foram as mais susceptíveis aos testes.

## CONCLUSÕES:

Considerando as condições de estudo, o agente que apresentou as maiores reduções em menor tempo de contato, e, portanto, o mais eficaz foi o ácido peracético (5 min; 6,8 log UFC/ml); seguido do hipoclorito de sódio (15 min; 6,5 log UFC/ml). Quanto à resistência antimicrobiana, apesar das cepas MDR aparentemente apresentarem maior formação de biofilme, nem todas apresentaram maior resistência contra a ação dos agentes avaliados.

## BIBLIOGRAFIA

ALONSO, V. P. P., FURTADO, M. M., IWASE, C. H. T., BRONDI MENDES, J. Z., & NASCIMENTO, M. D. S. (2022). Microbial resistance to sanitizers in the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1-16.

ANDRADE, N.J; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. Controle da higienização na indústria de alimentos. Higiene na indústria de alimentos - Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. 181-226. 2008

BRASIL, SINAN/SVS/Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico 2021: Doenças tropicais negligenciadas**. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim\\_especial\\_doencas\\_negligenciadas.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf).

BRITO FAE, DE FREITAS APP, NASCIMENTO MS. Multidrug-Resistant Biofilms (MDR): Main Mechanisms of Tolerance and Resistance in the Food Supply Chain. **Pathogens**. 2022; 11(12):1416. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121416>

CRUZ, Cristina D.; SHAH, Shreya; TAMMELA, Päivi. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-9, 3 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1321-6>.

CUSUMANO, Jaclyn A. *et al.* Weak biofilm formation among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 4, p. 114877, 2019.

GALIÉ, S., GARCÍA-GUTIÉRREZ, C., MIGUÉLEZ, E.M., VILLAR, C.J., LOMBÓ, F. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, article 898, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00898

MAGIORAKOS, A. P., SRINIVASAN, A., CAREY, R. B., CARMELI, Y., FALAGAS, M. E., GISKE, C. G., ... & MONNET, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, 18(3), 268-281.

MØRETRO, T., HEIR, E., NESSE, L.L., VESTBY, L.K., LANGSRUD, S. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532 -544, 2012

OIE - World Organisation for Animal Health (2016). The OIE Strategy on Antimicrobial Resistance and the Prudent Use of Antimicrobials. Disponível em [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/MediaCenter/docs/pdf/PortailAMR/ENOIE-AMR\\_strategy.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/MediaCenter/docs/pdf/PortailAMR/ENOIE-AMR_strategy.pdf)

PITTS, B., HAMILTON, M. A., ZELVER, N., & STEWART, P. S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of microbiological methods*, 54(2), 269–276. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00034-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00034-4)

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 339-343, 2003.

WHO – World Health Organization. **Salmonella (non-typhoidal)**. Disponível em [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-(non-typhoidal)).