

Capítulo 14

Adesão de *Pseudomonas aeruginosa* em galões de polipropileno e controle por sanitização química

ANDRADE JUNIOR, J. P.^{*1}; BORGES, L. A.¹; CARVALHO, M. D.¹; MOURA A. L. C.¹;
ALMEIDA, K. V.¹; CARELI, R. T.²

Resumo

Objetivou-se avaliar a estirpe de *P. aeruginosa* ATCC 27853 quanto à sua capacidade de adesão em polipropileno, ao seu potencial de biotransferência para água mineral e à sua susceptibilidade frente a soluções de hipoclorito de sódio. Constatou-se um processo de adesão aos cupons de polipropileno de 6,27 Log UFC/cm² após cinco dias. *P. aeruginosa* teve a capacidade de se biotransferir para a água em concentração de 5,57 Log UFC/mL, não apresentando diferença ($P > 0,05$) em relação aos tempos de 24, 48 e 72 h. Células aderidas de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade às soluções de Hipoclorito de Sódio. Observou-se diferença ($P < 0,05$) na redução do número de células aderidas ao polipropileno entre a solução controle e as soluções sanitizantes. Verificou-se que 5 min foram suficientes para eliminar a quantidade de células aderidas em cupons de polipropileno quando submetidas a procedimentos de sanitização com Hipoclorito de Sódio a 200 e 400 mg/L. A concentração inibitória mínima de hipoclorito de sódio (200mg/L) foi eficiente para eliminar todas as células aderidas em um curto intervalo de tempo (5 min), sendo essa uma metodologia aplicável para a higienização de galões de 20 L na indústria de água mineral.

Palavras-chave: Água mineral. Biofilmes. Biotransferência. Hipoclorito de sódio.

Introdução

A água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou artificialmente captada, de origem subterrânea, caracterizada por conteúdo definido, constante de sais minerais e outros constituintes. Além disso, não deve apresentar risco à saúde do consumidor (BRASIL, 2000). Sendo assim, deve ser captada, processada e envasada obedecendo às condições higiênico sanitárias e as boas práticas de fabricação (CARDOSO *et al.*, 2003).

¹ Graduando(a) em Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

² Professor Associado, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

Antes do envase da água mineral, é necessário que os galões retornáveis passem por uma operação de sanitização que se dá por procedimentos físicos ou químicos que sejam de eficiência comprovada e aprovados pelo Departamento Nacional de Produção Mineral. Na sanitização por meios físicos, os galões são submetidos a temperaturas elevadas pela exposição ao vapor ou imersão em água quente. No caso de uma sanitização através de agentes químicos, utiliza-se de ácidos orgânicos ou umectantes. Por apresentarem valor mais acessível, geralmente são utilizados compostos clorados, iodados e quaternários de amônia (CARDOSO *et al.*, 2003).

Com relação à qualidade microbiológica, as águas minerais podem apresentar estirpes bacterianas inócuas antes do tratamento, do engarrafamento, do processamento ou mesmo proveniente do ambiente. Dentre os contaminantes microbiológicos preocupantes destacam-se espécies patogênicas e patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria é capaz de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos, sendo a espécie mais comumente isolada em amostras de águas minerais naturais comercializadas em galões de 20 L no Brasil. *P. aeruginosa* é capaz de aderir e formar biofilmes em vários tipos de superfícies. Os biofilmes podem ser definidos como uma estrutura coletiva de células microbianas protegidas por uma matriz polissacarídica ou proteica que é sintetizada pelas células e aderente tanto a superfícies inativas ou vivas (PARSEK e TOLKER-NIELSEN, 2008).

Diante disso, objetivou-se avaliar a estirpe de *P. aeruginosa* ATCC 27853 quanto à sua capacidade de adesão em polipropileno, ao seu potencial de biotransferência para água mineral e à sua susceptibilidade frente a soluções de hipoclorito de sódio.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi avaliada a estirpe de *P. aeruginosa* ATCC 27853, que faz parte da bacterioteca deste laboratório.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do hipoclorito de sódio foi realizada utilizando-se o método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio (NCCLS, 2005). Inoculou-se 12,5 µL da suspensão bacteriana com turbidez ajustada com a solução padrão de McFarland 0,5 em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de soluções de NaOCl em Caldo BHI (Himedia®) nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 mg/L. Após homogeneização em vórtex por 2 min, os tubos permaneceram a 35 °C ± 2 °C por 24 h. Posteriormente, o crescimento microbiano

foi avaliado por meio de adição de 125 µL de Cloreto de Tetrafeniltetrazólio (TTC), que indica a multiplicação celular, apresentando coloração avermelhada na presença de células viáveis (KLANCNIK *et al.*, 2010)

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), 0,1 mL de cada tubo de ensaio que não apresentou coloração avermelhada foi plaqueado por *Spread Plate* em placas contendo Ágar Mueller Hinton (Himedia®). As placas foram incubadas a 35 °C ± 2 °C por 24 h para observação de crescimento microbiano (NCCLS, 2005).

Para o estudo de adesão bacteriana, a estirpe permaneceu mantida em tubos com tampa apitada (Eppendorf®) com capacidade de 1 mL, contendo BHI (Himedia®) e glicerol a 30%, mantidos a - 20 °C. Para o preparo das suspensões utilizadas na análise, a cultura foi ativada por duas vezes consecutivas em caldo BHI com incubação a 35 °C ± 2 °C por 24 h. A cultura ativa foi centrifugada a 10000 x g por 10 minutos e os pellets foram lavados com solução de NaCl a 0,85%. A suspensão bacteriana foi preparada por ressuspensão dos pellets em água peptonada e inoculada em Erlenmeyer com 99 mL de água mineral esterilizada de modo a obter uma concentração de 2 Log UFC/mL, concentração baseada na metodologia de Eiroa, Junqueira e Silveira, (1997). A seguir, foram adicionados ao Erlenmeyer 11 cupons (2 cm x 2 cm x 0,1 cm) de polipropileno, material que compõe galões de água mineral de 20 L, previamente esterilizados a 121 °C por 15 min. Esse sistema experimental foi mantido sob condições estáticas por cinco dias em temperatura ambiente, buscando simular a realidade do consumo de água acondicionada em galões de água com capacidade de 20 L em ambientes domésticos. Esse período foi dimensionado com base na média de consumo de água mineral em famílias de quatro pessoas.

Para a quantificação das células bacterianas aderidas, um cupom foi retirado, rinsado por 1 min em 10 mL de solução de NaCl a 0,85% para retirada de células planctônicas (não aderidas), transferidos para 10 mL de solução de NaCl a 0,85% e sonicados por 2 min usando banho de Ultrassom a 40 kHz para desprendimento das células sésseis (aderidas). Diluições decimais seriadas e sucessivas foram realizadas, seguidas de plaqueamento pela técnica de Microgotas em Ágar Cetrímide (Himedia®) e incubação a 35 °C ± 2 °C por 24 h. As células aderidas foram quantificadas e os resultados foram expressos em UFC/cm².

Na avaliação do potencial de biotransferência das células aderidas aos cupons para a água mineral sem inoculação, um cupom foi retirado do sistema experimental e colocado em um novo sistema com 20 mL de água mineral esterilizada. Esse novo sistema foi mantido sob condições estáticas nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. A cada tempo avaliado, alíquotas de 100 µL foram retiradas

e submetidas a diluições decimais seriadas sucessivas seguidas de plaqueamento por microgotas em Agar Cetrimide incubação a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

Para testar a sensibilidade das células aderidas diante da solução sanitizante de hipoclorito de sódio (NaOCl), nove cupons foram submetidos à rinsagem com solução de NaCl a 0,85%. Em seguida, seis destes cupons foram transferidos para a solução sanitizante, composta por NaOCl, nas concentrações encontradas na CIM e na CBM em testes anteriores para a estirpe de *P. aeruginosa*. A solução testada como controle foi formulada com os mesmos componentes da solução de NaOCl, no entanto, sem a presença deste. Os tempos de contato dos cupons com a solução de NaOCl e controle foram de 5, 7,5 e 10 min. Após o tempo de contato dos cupons com a solução de NaOCl, os mesmos foram deixados por um minuto em contato com uma solução de Tiosulfato de Sódio a 0,25% para neutralização do resíduo sanitizante. Para quantificação das células bacterianas após sanitização, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para a retirada de células aderidas e os resultados foram expressos em UFC/cm².

O experimento foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento. Para verificar o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio sobre as células aderidas, os valores UFC/cm² foram transformados em $\log(x+1)$ para atender a pressuposição da normalidade. As análises estatísticas foram realizadas a 5% de probabilidade e os resultados foram analisados com o auxílio do SAEG.

Resultados e discussão

Constatou-se que as concentrações de 200 mg/L e 400 mg/L de NaOCl foram a CIM e a CBM, respectivamente. Rutala *et al.* (1998), também testaram soluções de NaClO frente a essa espécie bacteriana e observaram que a CIM e a CBM foi 100 mg/L. Esses autores verificaram que a cepa de *P. aeruginosa* apresentou susceptibilidade ao NaClO em concentração mais baixa do que as utilizadas no presente estudo.

Após cinco dias, observou-se que os cupons de polipropileno apresentaram, em média, uma adesão de *P. aeruginosa* de 6,27 Log UFC/cm². Esta concentração celular aderida ao polipropileno pode ser considerada muito elevada, visto que a água mineral estava com uma contaminação inicial de 2,0 Log UFC/mL. Com o passar do tempo de experimentação, as células de *P. aeruginosa* tiveram capacidade de se multiplicar em água e aderir ao polipropileno em uma concentração relativamente alta, que quase pode ser considerada como um biofilme bacteriano. De acordo com Andrade, Bridgman e Zottola (1998), para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 7

Log UFC/cm². Dessa forma, constatou-se um mecanismo de adesão de células de *P. aeruginosa* na superfície de polipropileno. Fato este que não reduz o problema de contaminação destas superfícies, pois em condições apropriadas de umidade, nutrientes, tempo e temperatura, células de *P. aeruginosa* podem continuar se multiplicando e produzindo substâncias poliméricas extracelulares para a formação do biofilme bacteriano. As células sésseis, presentes no biofilme, podem se desprender e contaminar outros ambientes, água e alimentos, promovendo prejuízos econômicos e riscos à saúde dos consumidores, além de serem mais resistentes aos processos de sanitização (OLIVEIRA, BRUGNERA e PICCOLI, 2013).

Pedrosa *et al.* (2014) observaram que isolados de *P. aeruginosa* foram capazes de produzir biofilmes em galões de água mineral a 25 °C. Essa temperatura foi semelhante à utilizada no presente estudo, o que demonstra que a presença de *P. aeruginosa* em água mineral envasada em galões de 20 L pode ocasionar a formação de biofilmes durante a armazenagem e ao decorrer do consumo após a comercialização.

A biotransferência de *P. aeruginosa* foi, em média, 5,57 Log UFC/mL e não foi constatada diferença ($P>0,05$) no número de células transferidas para a água quando se avaliaram os tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Esta concentração celular é extremamente elevada e preocupante, uma vez que a Resolução n° 275 da ANVISA (BRASIL, 2005), permite que águas minerais apresentem valores máximos de 0,3 Log UFC/100 mL da espécie bacteriana avaliada em água mineral.

A solução controle não apresentou efeito inibitório ($P>0,05$) frente ao microrganismo testado. De acordo com a Tabela 1, após o contato dos cupons com a solução controle por 5; 7,5 e 10 min, foi possível constatar a presença de células aderidas em concentrações iguais ou superiores a 5,89 Log UFC/cm² ($P>0,05$).

Células de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade às soluções de NaOCl. Observou-se diferença ($P<0,05$) na redução do número de células aderidas ao polipropileno entre a solução controle e as soluções sanitizantes (Tabela 1). Além disso, verificou-se que todos os tempos de contato testados foram suficientes para eliminar a quantidade de células aderidas em cupons de polipropileno quando submetidas a procedimentos de sanitização com NaOCl a 200 e 400 mg/L, que foram as concentrações encontradas na CIM e na CBM respectivamente (Tabela 1). Queiroz e Day (2007) investigaram a efetividade de NaOCl a 2500 mg/L frente a biofilmes de *P. aeruginosa* em superfícies de alumínio e aço inoxidável. Esses autores observaram que 5 min foi suficiente para reduzir 4 Log e 5 Log respectivamente no número de células aderidas em alumínio e aço inoxidável, respectivamente.

Tabela 1 - Número de células aderidas (log UFC/cm²) de *Pseudomonas aeruginosa* em superfície de polipropileno, após cinco dias a 26 °C ± 2 °C, em contato com água mineral, após diferentes tempos de contato com soluções de Hipoclorito de Sódio e solução controle

Tratamentos	Tempo de contato (min)		
	5	7,5	10
Controle	6,04 Aa	6,02 Aa	5,89 Aa
NaOCl 200 mg/L	<1,00 Ba	<1,00 Ba	<1,00 Ba
NaOCl 400 mg/L	<1,00 Ba	<1,00 Ba	<1,00 Ba

Fonte: Dos autores, 2019.

Legenda: NaOCl: Hipoclorito de Sódio.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Como houve redução total no número de células sobreviventes após os tratamentos com ambas as concentrações de NaOCl, independente do tempo de exposição (Tabela 1), pode-se sugerir um tratamento sanitizante eficiente com um procedimento utilizando uma menor concentração do produto químico (200 mg/L) e um menor tempo de exposição (5 min). Desse modo, este protocolo de higienização poderia refletir em menor geração de resíduos de sanitizante e em menor tempo para uma sanitização eficiente.

Conclusão

A estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresenta uma alta capacidade de aderir à superfície de galões de polipropileno, o que evidencia uma possível ocorrência de formação de biofilmes. As células de *P. aeruginosa* aderidas apresentaram um alto potencial de biotransferência, além de terem se multiplicado facilmente na água mineral. Dessa forma, o baixo teor de nutrientes no meio não foi um fator limitante para o seu crescimento e sua capacidade de aderir à superfície. As soluções sanitizantes de Hipoclorito de Sódio nas concentrações de 200 e 400 mg/L foram capazes de eliminar totalmente as células aderidas ao polipropileno em todos os tempos testados.