

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

**CHAIANE REGINA RECH**

**ESTUDO DA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE  
*Escherichia coli* em PET poli(tereftalato de etileno) E RESISTÊNCIA  
A BIOCIDAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL**

**DOURADOS -MS**

**2013**

**CHAIANE REGINA RECH**

**ORIENTADOR: Kelly Cristina da Silva Brabes**

**ESTUDO DA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE  
*Escherichia coli* em PET poli(tereftalato de etileno) E RESISTÊNCIA  
A BIOCIDAS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na Área de Concentração em Ciência Ambiental.

**DOURADOS -MS**

**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil**

R296e Rech, Chaiane Regina.  
Estudo da adesão e formação de biofilme de *Escherichia coli* em PET poli(tereftalato de etileno) e resistência a biocidas / Chaiane Regina Rech – Dourados-MS : UFGD, 2013.  
71 f.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes.

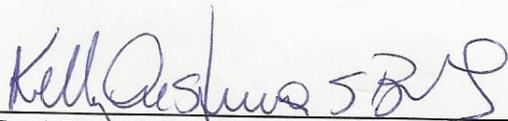
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Biofilme 2. *Escherichia coli* (bactéria). I. Brabes, Kelly Cristina da Silva. II. Título.

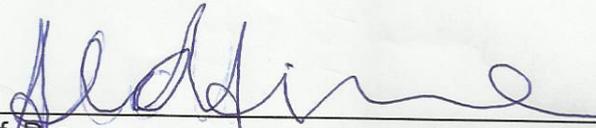
CDD: 661

## Termo de Aprovação

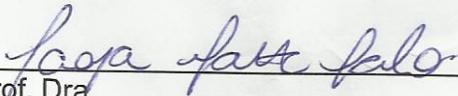
Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: ESTUDO DA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Escherichia coli* em PET poli(tereftalato de etileno) e RESISTÊNCIA A BIOCIDAS, de autoria de CHAIANE REGINA RECH, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes (Orientadora-UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dra.  
Júnia Capua de Lima Novello (UCS)



Prof. Dra.  
Farayde Matta Fakhouri (UFGD)



Prof. Dr.  
André Luís Duarte Goneli (UFGD)

Dourados/MS, 20 de novembro de 2013.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não  
sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não  
sou o que era antes.”*

*(Marthin Luther King)*

*A Deus, presença insubstituível em todos os  
momentos da minha vida.*

***Dedico.***

*Aos meus pais, Maria Carmen e Selito, pelo  
apoio incondicional.*

***Ofereço.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, presença real e constante em todos os momentos de minha vida. Por me amparar e me guiar o caminho certo sempre.

Aos meus queridos pais, pelos valores e ensinamentos dedicados. Agradeço por estarem ao meu lado sempre e não me deixarem desistir diante os obstáculos.

Aos meus irmãos e sobrinhos, pelo amor, compreensão e estímulo, alimentando-me de persistência e coragem.

Ao meu marido Gustavo, melhor amigo e companheiro, pelo carinho e paciência.

Aos amigos distantes que me encorajaram, pela força e amizade, Alessandra, Leandro, Tais e Aline.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade da realização deste curso e pelo aprendizado.

A Prof. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes, com grande gratidão, por ter me recebido e acreditado que eu não a iria decepcionar. Pela amizade, paciência e todo conhecimento transmitido.

Ao Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão, pela ajuda e ensinamentos. Por conceder a estrutura física para que fosse realizado todo o experimento e pela contribuição na banca de qualificação.

A Prof. Dra Gisele Jane de Jesus por compor a banca de qualificação e suas considerações de extrema valia.

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes pelas análises estatísticas.

Aos Profs. André Gonelli, Júnia Capua e Farayde Fakhouri pelas sugestões na banca de defesa.

A Msc. Lujan Nunes Sanabria Aliatti, técnica do Laboratório de Microbiologia, por todo apoio nos procedimentos. Pela amizade, confiança, distração e conhecimentos transmitidos. Obrigada por escutar minhas lamentações e por toda paciência.

A Regiane Balbino dos Santos, pela paciência nos ensinamentos básicos que serviram de base para que eu conseguisse realizar os procedimentos necessários para este trabalho. Muito Obrigada.

Aos colegas e amigos de laboratório, Késia, Cibelli, Lais, Thiago, Maísa, Karla, Patrícia, Simone e Éllen pela troca de conhecimento, apoio mútuo e momentos compartilhados.

A todos os acadêmicos de iniciação científica e bolsa permanência pela colaboração e amizade.

A todas as pessoas que ficaram no vórtex. Obrigada.

A todos os técnicos da Faculdade de Ciências da Saúde, que se tornaram minha família. Sentirei, imensamente, saudade de cada um de vocês.

Às pessoas que me receberam e me deram estadia, Edimara, Volnei e Madalena. Sou grata eternamente pelo apoio.

A todas as pessoas que, de alguma forma, nos momentos serenos e apreensivos, fizeram parte dessa trajetória. Agradeço de coração. Que sejam recompensados a altura.

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
AL	cido Lático
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Caldo de Infuso de Cérebro e Corao
CIM	Concentrao Inibitória Mínima
CPP	Contagem Padrão em Placa
CRT	Cloro Residual Total
DC	Digluconato de Clorexidina
EPS	Exopolissacardeo ou Matriz Polimérica Extracelular
HS	Hipoclorito de Sódio
LMA	Laboratório de Microbiologia Aplicada
NaClO	Hipoclorito de Sódio
PCA	Plate Count Agar
PET	Poli(tereftalato de etileno)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Policloreto de Vinila
QA	Quaternário de Amônia
TSA	Agar Triptona Soja
UFC	Unidade Formadora de Colnia
UV	Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sanificantes testados em função da concentração e pH.....	33
Tabela 2. Perfil Antimicrobiano de <i>E. coli</i> ATCC 25922 e Selvagem Planctônicas a Sanificantes pelo Método de Disco-Difusão. ....	39
Tabela 3. Perfil Antimicrobiano da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de <i>E. coli</i> ATCC 25922 e Selvagem planctônica exposta a Sanificantes. ....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Avaliação do Crescimento Bacteriano das células planctônicas em Log UFC/mL de <i>E. coli</i> ATCC 25922 e Selvagem.....	36
<b>Figura 2:</b> Avaliação do Crescimento Bacteriano das células aderidas em Log UFC/cm <sup>2</sup> de <i>E. coli</i> ATCC 25922 e Selvagem à superfície de PET.....	37
<b>Figura 3:</b> Contagem de células do biofilme em Log UFC/cm <sup>2</sup> comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 8h de <i>E. coli</i> ATCC 25922 e selvagem após a exposição aos sanificantes (A) Quaternário de Amônia (B) Ácido Lático (C) Digluconato de Clorexidina (D) Hipoclorito de Sódio. ....	43

## RESUMO

O biofilme é uma comunidade bacteriana séssil, ligada a um substrato e incorporada a uma matriz extracelular. É considerado um problema a saúde, devido seu potencial para atuar como fonte de contaminação da água, em consequência da resistência aos sanificantes. Desta forma, a higienização adequada das superfícies é importante para evitar a formação de biofilmes. Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme de *Escherichia coli* ATCC 25922 e selvagem em superfícies de garrafas de água mineral de 20 L, constituídas de poli(tereftalato de etileno), PET e descrever e avaliar a eficiência de sanificantes Quaternário de Amônia, Ácido Lático, 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 foi utilizado o método de disco-difusão e CIM (Concentração Inibitória Mínima) e para as células aderidas o teste de CIM. Os resultados obtidos indicaram formação de biofilme por ambos os microorganismos a partir do tempo de 4h. O Hipoclorito de Sódio não apresentou eficiência na redução populacional de células aderidas e planctônicas do que os demais sanificantes testados. O biofilme de 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 Lático, enquanto que para o Digluconato de Clorexidina apresentou crescimento em todas as concentrações. *E. coli* ATCC 25922 foi sensível apenas às menores concentrações de Quaternário de Amônia, Ácido Lático e Digluconato de Clorexidina. O estudo da dinâmica de adesão e a compreensão dos mecanismos de resistência servem de base para encontrar novas maneiras de erradicação de biofilmes em superfícies e, conseqüentemente, diminuir as contaminações em indústrias de alimentos.

Palavra-chave: *Escherichia coli.*; biofilme; poli(tereftalato de etileno); sanitizantes.

## ABSTRACT

Biofilm is a sessile bacterial community linked to a substrate and attached to an extracellular matrix. It is considered a health problem due to its potential use as a water contamination source once it is resistant to sanitizers. Thus, an adequate cleaning of the surfaces is important for preventing its formation. All in all, this study aimed to evaluate the ability of adhesion and the formation of *Escherichia coli*. ATCC 25922 and wild-type biofilms on the surfaces of mineral water bottles of 20L made out of poly (ethylene terephthalate), PET, in order to describe and evaluate the efficiency of the sanitizers: quaternary ammonium, lactic acid, chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite on the microbial reduction of the cells in both adhered and planktonic state. To analyze the efficiency of the sanitizers in planktonic state, we used the method of disk diffusion and MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and for the adhered cells, we used only MIC test. The results evidenced the formation of biofilms of both organisms from the duration of 4 h. Sodium hypochlorite did not present any efficiency in the planktonic and adhered cells' population reduction in comparison to the other sanitizers. The wild-type biofilm was vulnerable to all concentrations of quaternary ammonium and inhibited the growing until the concentration of 0,002 mg/L on lactic acid, whereas for chlorhexidine digluconate it presented a growing in all concentrations. *E. coli*. ATCC 25922 was vulnerable only to the minor concentrations of quaternary ammonium, lactic acid and chlorhexidine digluconate. The study of the adhesion dynamics and the comprehension of the resistance mechanisms give support to finding new manners of eradicating such biofilms on the surfaces and, consequently, to decrease the contamination of food industries.

**Keywords:** *Escherichia coli*.; biofilm, poly (ethylene terephthalate), sanitizers.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 HISTÓRICO .....	17
3.2 O BIOFILME BACTERIANO.....	18
3.3 FORMAÇÃO DE BIOFILMES .....	19
3.3.1 Fatores Genéticos.....	20
3.4 BIOFILMES EM MATERIAIS.....	21
3.4.1 Características de materiais na formação do biofilme.....	21
3.4.2 Galões de poli(tereftalato de etileno), PET.....	22
3.5 MICRO-ORGANISMOS.....	22
3.5.1 <i>Escherichia coli</i> . .....	23
3.6 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS .....	24
3.6.1 Avaliação de Resistência Antimicrobiana.....	25
3.7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE BIOFILMES.....	26
4. ARTIGO CIENTÍFICO .....	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	50
6 REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias podem aderir a superfícies sólidas e formar uma camada viscosa, caracterizando assim, os biofilmes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). A adesão se torna irreversível quando estes micro-organismos iniciam a produção de polímeros extracelulares (DONLAN, 2001), responsável por proteger a maioria das bactérias da opsonização e fagocitose, tornando-as difíceis de desalojar (STEPHENS, 2002).

Os biofilmes se formam, na maior parte, em superfícies sólidas (XAVIER et al., 2003) e tornam-se um problema, principalmente, na indústria de alimentos por ocasionar a contaminação e intoxicações e infecções alimentares (OLIVEIRA, 2011).

Desta forma, para fornecer um produto seguro ao consumidor, é essencial verificar e monitorar as condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios utilizados no processamento (OLIVEIRA et al., 2010) visto que, procedimentos de limpeza e desinfecção podem contribuir com o controle de biofilmes (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Sendo assim, a sanitização é importante para impedir a formação de um biofilme (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; PENG et al., 2002), pois visa eliminar os micro-organismos presentes nos equipamentos (MARRIOTT; GRAVANI, 2006). Para que haja eficácia, a sanitização deve ser realizada por meios físicos ou químicos. Os meios físicos caracterizam-se pela utilização do calor (vapor, água quente e ar quente), radiação ultravioleta e por processamento com alta tensão e por meio químicos, destaca-se o emprego de compostos clorados, iodados e quaternários de amônio, dentre outros (CARDOSO et al, 2003).

Superfícies hidrofóbicas como os plásticos, facilitam a adesão microbiana comparada a superfícies hidrofílicas (RODRIGUES et al., 2009). Além disso, as propriedades físico-químicas da superfície podem influenciar na adesão inicial e resistência dos micro-organismos, tanto quanto sua estrutura e composição (GHARECHAHI et al., 2012).

Em virtude disso, um fator preocupante para as indústrias é a higienização dos galões retornáveis de água mineral. É necessário a adoção de métodos adequados para que as recomendações de qualidade microbiológica sejam atingidos. Por isso, é de

grande importância avaliar a eficácia de sanitizantes químicos como antimicrobianos frente a possível formação de biofilme em poli(tereftalato de etileno), PET, em função do pH.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme em superfície de poli(tereftalato de etileno), PET, utilizando *Escherichia coli* ATCC 25922 e selvagem e a resistência a sanitização química.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a adesão e formação de biofilme em superfície de poli(tereftalato de etileno), PET, utilizando ATCC 25922 e selvagem;
- Comparar a capacidade de adesão e formação de biofilme de *E.coli* ATCC 25922 e selvagem;
- Avaliar o perfil de resistência de cada micro-organismo perante os sanificantes;
- Comparar o perfil de resistência bacteriano e a eficiência dos sanificantes aos micro-organismos.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 HISTÓRICO

Em meados do século XVII, Van Leeuwenhoek por meio da utilização de um microscópio rudimentar, observou em uma superfície dentária composta por biofilmes microbianos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN, 2002). Tornou-se então, o primeiro a observar organismos microscópios que seriam importantes implicações para o campo da saúde (POPAT et al., 2008). Em 1943, estudos realizados por Zobell (1943) no ambiente marinho, demonstraram que o número de bactérias aderidas à superfície eram significativamente maior que no meio circundante.

Já em 1978, Geesey, Mutch e Costerton, adaptaram métodos de contagem de bactérias do biofilme e compararam o número de células planctônicas com as aderidas em um córrego. Concluíram que a atividade metabólica e a quantidade de bactérias do biofilme predominaram em relação às móveis.

Biofilmes são isolados de muitos ambientes (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2009) devido ao interesse de cientistas no estudo de processos de desenvolvimento de biofilmes em superfícies (JOSEPH et al., 2001; HAÜSSLER; PARSEK, 2010). E foram necessários novos instrumentos de análise, resultando em colaborações entre microbiologistas, engenheiros ambientais e matemáticos, que conduziram a definição atual de biofilme (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999)

Trabalhos têm apresentado programas de expressão gênica em biofilmes que podem fornecer ideias para novas abordagens terapêuticas (STEPHENS, 2002). Outros avanços facilitaram o estudo de biofilmes, como a microscopia de luz (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999;) e de varredura, que permitem melhor visualização da adesão, desenvolvimento e formação de biofilmes, principalmente, em indústrias de processamento de alimentos (PARIZZI et al., 2004).

A partir disso, diversas pesquisas são realizadas nas áreas de processamento de alimentos, devido as condições favoráveis a fixação e formação de biofilmes na superfície destes ambientes (GIBSON et al., 1999; NYENJE; GREEN; NDIP, 2012). Essa adesão e desenvolvimento microbiano causam muitos problemas para as indústrias

(POULSEN, 1999; JOSEPH et al., 2001), podendo ser fonte de contaminação de alimentos (MICHU et al.; 2011).

Além disso, estudos demonstram a resistência das células aderidas em relação a desinfetantes (GUTIÉRREZ et al., 2012; ABUSHELAIBI; AL SHAMSI; AFIFI, 2012), perante a dificuldade da eliminação de biofilmes em superfícies e a necessidade de um processo de higienização adequado (CAIXETA et al., 2010).

### 3.2 O BIOFILME BACTERIANO

As bactérias em estado planctônico, ou seja, livres no meio circundante, podem aderir a superfícies sólidas e formar uma matriz extracelular, caracterizando assim, os biofilmes ou células aderidas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999;). Este termo tem sido utilizado para descrever a população de células microbianas inserida em uma matriz polimérica extracelular (EPS) (LAZAR, 2011), constituída, principalmente, por proteínas e polissacarídeos (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010; JAHN, NIELSEN, 1998; WINGENDER; NEU; FLEMMING, 1999). Essas comunidades microbianas são de suma importância para a sobrevivência e persistência de bactérias em ambientes inóspitos (JOHNSON, 2008).

Em uma definição mais completa, o biofilme é uma comunidade bacteriana sésil, ligada a um substrato e incorporada ao EPS com fenótipo alterado em relação à transcrição genética e taxa de multiplicação (DONLAN; COSTERTON, 2002). Por conta disso, e sob condições ambientais adequadas, todos os micro-organismos podem formar biofilme (LASA et al., 2005), tanto em ambientes bióticos quanto abióticos (BOARI et al., 2009).

A formação de biofilmes ocorre, basicamente, em três estágios. Inicia pela fixação do micro-organismo em uma superfície, seguida da multiplicação e formação de colônias que secretam o EPS, após ocorre o desenvolvimento de um biofilme maduro, com liberação de células planctônicas (ZEIGER et al., 2010). Essa colonização microbiana tem atraído atenção de cientistas de diferentes áreas, como a medicina, ambiente aquático e indústria de processamento de alimentos (JOSEPH et al., 2001).

Os biofilmes microbianos são, naturalmente, formados por duas ou mais espécies que auxiliam na multiplicação e adesão uma das outras (KASNOWSKI et al., 2010). A capacidade dos micro-organismos em aderir a superfícies e formar biofilmes

tem grandes implicações em indústrias de processamento de alimentos (VAN HOUTT; MICHIELS, 2010). Além disso, plásticos, como o polietileno utilizado em embalagens de alimentos, não são esterilizados, podendo facilitar a contaminação (LE MAGREX-DEBAR et al., 2000).

Outros materiais comumente utilizados em ambientes de indústrias de alimentos podem sofrer a adesão bacteriana, como vidro (MARQUES et al., 2007), cimento (VAN HOUTT; MICHIELS, 2010), policloreto de vinila (BAN et al., 2012) e aço inoxidável (BAN et al., 2012; MICHU et al., 2011; MARQUES et al., 2007). Por conta disso, podem ocasionar danos a qualidade dos alimentos (MARQUES et al., 2007) e problemas a saúde pública, como surtos de intoxicações alimentares (SIMÕES; SIMÕES, VIEIRA, 2010; BRABES, 2005).

Desta forma, o estudo do conceito e formação de biofilme, dos aspectos de sua estrutura e composição, é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de controle na indústria de alimentos (OLIVEIRA et al., 2010).

### 3.3 FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Células planctônicas recebem estímulos que os conduzem a aderir a alguma superfície (OLIVEIRA et al., 2010). Esses estímulos que influenciam a adesão microbiana são tipo e propriedades dos materiais, presença de material orgânico, pH e temperatura (OULAHAL et al., 2008; VAN HOUTT; MICHIELS, 2010). Etapas que descrevem a formação de biofilme incluem: I. pré-condicionamento do substrato; II. transporte de célula bacteriana para a superfície; III. adsorção de células da superfície; IV. adesão celular permanente no substrato; V. produção de EPS e multiplicação celular; VI. desprendimento de células do biofilme (BRYERS; RATNER, 2006).

Inicialmente, ocorrem interações entre a bactéria e a superfície do material impulsionado por forças, como hidrofóbicas, eletrostáticas e Van der Waals. Na segunda fase, o biofilme é estabelecido na superfície através de reações moleculares e apenas na etapa subsequente que a maturação ocorre e as características estruturais do biofilme são desenvolvidas. Na quarta e última etapa, as células no biofilme retornam para vida planctônica como novos colonizadores iniciando novos ciclos de contaminação (ARCIOLA et al., 2012; SIMÕES; SIMÕES, VIEIRA, 2010).

### 3.3.1 Fatores Genéticos

A formação de biofilme requer a expressão genética para facilitar a adesão e maturação na superfície (MITRA et al., 2013). Genes estes que codifiquem características morfológicas como flagelos, *pili* e produção de lipopolissacarídeo, e que são considerados fatores de virulência (LIU; TAY, 2001). A produção dessas estruturas reforça a adesão em superfícies e facilita a persistência e sobrevivência em ambientes de processamento de alimentos, por exemplo (VAN HOUTT; MICHIELS, 2010).

Os flagelos são utilizados para motilidade do micro-organismo na superfície abiótica (PRATT; KOLTER, 1998) e facilitam a colonização de organismos patogênicos. O *pili* permite a fixação dos micro-organismos facilitando a colonização desses indivíduos a novas superfícies, além de influenciar no processo de transferência genética. A produção de lipopolissacarídeo é necessária para a adesão à sílica e outras superfícies e influencia na resistência do micro-organismo a antimicrobianos (LINDSAY; VON HOLY, 2006; VAN HOUTT; MICHIELS, 2010).

Comunidades microbianas produzem e secretam sinais moleculares chamados de auto-indutores (ARCIOLA et al., 2012). Esse mecanismo de comunicação denominado *quorum sensing* controla a expressão gênica em relação à densidade populacional do biofilme, sendo descrito, principalmente, em bactérias Gram-negativas (SUNTHARALINGAM; CVITOVITCH, 2005; ANAND; RAI; THATTAI, 2013).

Quando essa comunidade atinge um determinado número populacional e ocorre acúmulo dos auto-indutores, um regulador de transcrição é ativado para controlar a expressão de genes, incluindo geralmente uma série de fatores de virulências (KONG; VUONG; OTTO, 2006), como motilidade, esporulação e capacidade de adesão e formação de biofilmes (HAMMER; BASSLER, 2003). Além disso, esse mecanismo de comunicação está envolvido em todas as fases de formação de biofilme, por regular a densidade populacional e a atividade metabólica dentro do biofilme maduro de forma a adequar a demanda de nutrientes com o de recursos disponíveis (SKANDAMIS; NYCHAS, 2012).

A comunicação intercelular pode ser de duas formas: i. intra-específica, importante para a fenótipo da célula e regulação do comportamento no ambiente; ii. interespecífica, responsável pela linguagem “universal” que permite a comunicação entre as bactérias. Desta forma, o *quorum sensing* tem grande impacto na arquitetura e

formação de biofilmes, além de contribuir para a fisiologia microbiana e fatores de virulência (KONG; VUONG; OTTO, 2006; LAZAR, 2011).

A formação de biofilme é um processo dinâmico e diversos mecanismos estão envolvidos na fixação e multiplicação microbiana, como as substâncias poliméricas extracelulares (ABUSHELAIBI; AL SHAMSI; AFIFI, 2012), que contribuem para a arquitetura final do biofilme (BRANDA et al., 2005) sendo formado por polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas e glicolípideos (JAHN, NIELSEN, 1998; WINDENGER; NEU; FLEMMING, 1999).

A matriz de exopolissacarídeo interage com o ambiente e facilita a adesão de micro-organismos na superfície, além de fornecer nutrientes para os organismos inseridos no biofilme (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007) e proteger das forças do ambiente (STOODLEY et al., 2002; LÓPEZ et al., 2010), como impedir a penetração de antimicrobianos (TRACHOO, 2003). É uma característica comum a todos os biofilmes, porém sua natureza varia de acordo com as condições de multiplicação e do substrato (LÓPEZ et al., 2010).

### 3.4 BIOFILMES EM MATERIAIS

#### 3.4.1 Características de materiais na formação do biofilme

Propriedades físico-químicas da superfície podem influenciar na adesão inicial dos micro-organismos, tanto quanto sua estrutura e composição (GHARECHAHI; MOOSAVI; FORGHANI, 2012). Canais e fissuras podem facilitar a fixação e alojamento de bactérias, além de dificultar os procedimentos de higienização (DIAS et al., 2010).

Desta forma, os micro-organismos tendem a aderir mais facilmente em superfícies hidrofóbicas, como os plásticos, do que em hidrofílicas, como os vidros e metais (RODRIGUES et al., 2009). Careli et al. (2009) observou através da microscopia de epifluorescência e de varredura, elevado número de células aderidas em mármore e granito, devido a alta porosidade, fissuras, ondulações e depressões, ou seja, em função das características físicas desses materiais.

### 3.4.2 Galões de poli(tereftalato de etileno), PET

Em 1946, Whinfield e Dickson descobriram o PET, um termoplástico polar, com alta temperatura de fusão e estabilidade dimensional (ROMÃO; SPINACÉ; DE PAOLI, 2009), podendo ser usado na indústria de galões de 20 L.

Na busca de água de qualidade em relação às características microbiológicas e físico-químicas, vem sendo observado um aumento no mercado consumidor de água mineral engarrafada e, conseqüentemente, aumento na produção de embalagens de PET. Essas embalagens são retornáveis e sua higienização tem sido um fator preocupante nas indústrias (RITTER; TONDO, 2009), pois todo o processo de fabricação deve obedecer às condições higiênico-sanitárias, garantindo assim que a água mineral natural não apresente risco à saúde do consumidor (CARDOSO et al., 2003). Segundo Leclerc e Da Costa (1998), após o envase de água nos garrafões, o número de micro-organismos na água pode aumentar, atingindo  $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL, este fato pode estar relacionado com a má higienização das garrafas.

Desta forma, desde 2009, entrou em vigor as Portarias do Departamento Nacional de Produção Natural, que estabelecem vida útil de 3 anos para os galões de PET de 10 e 20L (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009). Assim, durante esse tempo, é necessário que as indústrias de água mineral realizem adequadamente a higienização dessas embalagens de acordo com a legislação que prevê as boas práticas de industrialização e comercialização de água natural e mineral (BRASIL, 2006). Porém, o uso de antimicrobianos como desinfetantes e sanificantes, deve ser utilizado corretamente para evitar que resíduos tóxicos fiquem na superfície e afetem a qualidade final do produto (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

### 3.5 MICRO-ORGANISMOS

Estudos revelam a formação de biofilmes por espécies de bactérias como *Staphylococcus* sp. (BOARI et al., 2009; KRÓLASIK et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010), *Escherichia coli* (RODRIGUES et al., 2010), *Pseudomonas* sp. (KRÓLASIK et al., 2010), *Aeromonas* sp. (BOARI et al., 2009), *Listeria* sp. (PAN; BREIDT JR; KATHARIOU, 2010; RODRIGUES et al., 2010), *Streptococcus* sp.

(SUNTHARALINGAM; CVITKOVITCH, 2005) e *Enterococcus* sp (DENG et al., 2009).

### 3.5.1 *Escherichia coli*.

Falcone Dias e Farache Filho (2013) analisaram garrafas de água mineral de 0,5, 1,5 e 20L de quatro marcas comerciais. Verificaram que pode ocorrer variação na contagem de micro-organismos após o engarrafamento, pois neste processo não há alteração da composição natural da água mineral, ou seja, populações bacterianas se desenvolvem a partir de pequenas populações individuais advindas da fonte. Além disso, estes micro-organismos podem anexar ao recipiente e se multiplicar devido à presença de matéria orgânica na água, como bicarbonato e sólidos dissolvidos totais em função da fonte.

Outras características das células bacterianas também interferem na adesão. Segundo Boari e colaboradores (2009), quanto mais hidrofóbica for a célula bacteriana maior a sua capacidade em aderir a superfícies como o aço inoxidável. Sendo assim, bactérias Gram-negativas, devido a seus fatores de virulência, apresentam uma vantagem em relação a bactérias Gram-positivas no que diz respeito à adesão inicial, colonização da superfície e formação de biofilme.

Diversas espécies microbianas podem formar biofilme, entre elas da família das enterobactérias como *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa que pode viver associada a uma superfície ou livre no ambiente (TSCHOWRI; LINDENBERG; HENGGE, 2012). Fatores genéticos, como a produção de lipopolissacarídeos, mecanismo que auxilia na adesão microbiana (STEVENSON et al., 1996), a presença de flagelos que facilita a propagação das células na superfície através da motilidade e o *pili* (BELOIN; ROUX; GUIGO, 2008) estabelecem *E. coli* como um micro-organismo modelo para o estudo da formação de biofilmes. Bem como, o *quorum-sensing* que influencia a formação de biofilme por *E. coli* em ambientes naturais (VAN HOUDT; MICHIELS, 2005).

Por ser de origem fecal, *E. coli* é usada como indicador de qualidade da água e de ambiente de processamento de alimento (VAN HOUDT; MICHIELS, 2005), sendo encontrada, comumente em água. Sendo assim, a importância do estudo com *E. coli* está relacionado com o seu potencial patogênico e a resistência a antibióticos.

Estudos relacionados à adesão em superfícies por *E. coli* tem sido realizados. Ryu e Beuchat (2005) avaliaram a resistência de *E. coli* aderidas a cupons de aço inoxidável, Terada et al. (2012) investigaram a adesão em polietileno e Ban et al. (2012) analisaram a formação de biofilme em policloreto de vinila (PVC). Igualmente, diversas infecções microbianas estão associadas à formação de biofilme, tendo *E. coli* como o micro-organismo mais comum de infecção de trato urinário (FERRIÉRES et al., 2007).

### 3.6 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Células associadas em biofilme são mais resistentes a antibióticos, detergentes e cloro (WATNICK; KOLTER, 2000). A resistência de micro-organismos patogênicos está atribuído, frequentemente, ao uso inadequado ou em excesso de antibióticos e a transmissão de genes de resistência entre os indivíduos em biofilme (BORGES et al., 2013) através do *quorum sensing*. Além disso, o EPS serve de barreira, e impede que o agente tóxico chegue às camadas mais profundas do biofilme (KRÓLASIK et al., 2010) além de conferir proteção contra radiações ultravioletas (UV), alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI et al., 2009).

Marques et al. (2007) ao avaliarem a eficiência de sanificantes químicos, na remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, observaram que nenhum deles removeu completamente as células aderidas nas superfícies de aço inoxidável e vidro, apenas houve redução na multiplicação microbiana. Da mesma forma, em estudos realizados por Simões et al. (2008), tanto os biofilmes de *Bacillus cereus* quanto de *Pseudomonas fluorescens* foram resistentes ao antimicrobianos testados, evidenciando assim, que micro-organismos em biofilme estão mais protegidos aos agentes antimicrobianos e a fatores externos.

Os produtos ativos permitidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 1988) para uso em indústrias de processamento de alimentos, são: aldeídos, fenólicos, quaternários de amônia, compostos orgânicos e inorgânicos liberadores de cloro ativo, iodo e derivados, alcoóis e glicóis, biguanidas e outros, desde que atendam a legislação específica.

Os compostos de amônio quaternário são amplamente utilizados em indústrias de alimentos por sua eficiência como desinfetantes, com baixa toxicidade, não corrosão

e ação surfactante. Além disso, por ter sua ação relacionada à membrana celular, causa danos aos componentes celulares e desnaturação de proteínas e enzimas da célula microbiana (MIYAGI; TIMENETSKY; ALTERTHUM, 2000; TAKENAKA et al., 2007), tendo como principal agente as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (MYSZKA; CZACZYK, 2011).

O Hipoclorito do Sódio (HS) tem seu mecanismo de ação parecido com o Quaternário de Amônia (QA), por interferir na membrana citoplasmática, alterar a síntese de metabolismo celular e degradação de fosfolipídios. Alguns sanificantes como o HS, podem ter sua ação reduzida ou eliminada na presença de compostos orgânicos, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos, que constituem a matriz de EPS (OLIVEIRA et al., 2010; VIDAL; RAGOT; THIBAUT, 1997).

As guanidinas e biguanidas são usadas para a desinfecção de água e sanitização de superfícies (EGUCHI, 2007). O desinfetante mais comumente utilizado é o Digluconato de Clorexidina (DC) substância com a capacidade de aderir na parede celular de bactérias Gram-negativas e positivas, causar a precipitação de proteínas, coagulação do citoplasma e lise de componentes intracelulares (FARDAK et al., 1985; ZANATTA; RÖSING, 2007).

A atividade antimicrobiana do Ácido Lático (AL) deve-se ao fato de este ácido não dissociado poder atravessar a membrana celular microbiana reduzindo o pH intracelular interferindo nas funções metabólicas do micro-organismo (NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999).

### 3.6.1 Avaliação de Resistência Antimicrobiana

Estudos relacionados a biofilmes podem facilitar a compreensão em relação aos mecanismos de resistência a antimicrobianos (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2009). Diversos métodos têm sido utilizados para isso, como método de disco difusão preconizado pela Clinical and Standards Institute (CLSI), que consiste na infusão de discos de antibióticos em Agar, após espalhar sobre a superfície o micro-organismo com o auxílio de um *swab* (TYERMAN et al., 2013) e a Concentração Inibitória Mínima (CIM), em que várias concentrações do antibiótico são testados para avaliar a suscetibilidade do micro-organismo (AGARWAL et al., 2005).

O perfil de resistência antimicrobiana com sanificantes pode ser realizado com base nos testes de diluição de uso ou de suspensão. O primeiro inclui o uso de *swab*, rinsagem e placa de contato, enquanto que o teste de uso simulado baseia-se em simulações das condições da indústria (AKUTSU, 2001).

### 3.7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE BIOFILMES

O avanço da microscopia eletrônica facilitou a visualização da formação e adesão microbiana e confirmou que a matriz do biofilme é formada por exopolissacarídeos (BARNES; CASKEY, 2002; PARIZZI et al., 2004). Diferentes técnicas microscópicas podem ser utilizadas para avaliar a formação de biofilmes, sendo as mais utilizadas a epifluorescência, força atômica e varredura.

A microscopia de epifluorescência utiliza a coloração para visualizar ou contar as células aderidas como realizado por Pan, Breidt Jr. e Kathariou (2006) ao avaliarem a resistência de biofilmes de *Listeria monocytogenes* a agentes sanificantes. Através da microscopia, visualizaram que mesmo após 21 dias, ainda era possível observar células bem definidas aderidas nas superfícies estudadas.

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para observar a morfologia microbiana no biofilme (PARIZZI et al., 2004) e tem sido empregada para avaliar, também, a topografia das superfícies (SCHMIDLIN et al., 2013). Outra técnica comumente utilizada é a microscopia de força atômica, que tem sido utilizada para quantificar as forças de adesão (XU et al., 2013), além das propriedades físicas da superfície, como a rugosidade (TERADA et al., 2012).

O método de Contagem Padrão em Placa (CPP) também é utilizado para avaliação da formação de biofilmes. Em experimento realizado por Oliveira et al (2010) as células aderidas aos cupons de aço inoxidável foram rinsadas em solução salina para remoção das células planctônicas. Em seguida, para remoção de células aderentes, utilizou-se *swab* que foram transferidos para tubos de ensaio com salina e agitados em vórtex por um minuto. Após foram feitas diluições seriadas em solução salina e plaqueados 100µL em Agar Triptona de Soja (TSA) e incubadas a 37°C por 24h.

# CAPÍTULO I

## 4. ARTIGO CIENTÍFICO

**Título: Estudo da Adesão e Formação de Biofilme de *Escherichia coli* em PET Poli(Tereftalato De Etileno) e Resistência a Biocidas.**

Chaiane Regina Rech<sup>1</sup>, Kelly Cristina da Silva Brabes<sup>2</sup>, Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes<sup>3</sup>, Lujan Nunes Sanabria Aliatti<sup>4</sup>, Kesia Esther Silva<sup>4</sup>, Laís Gonçalves Ortolani<sup>4</sup>, Fábio Juliano Negrão<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Engenharia, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

<sup>3</sup> Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

Palavras-chave: biofilme, biocidas, *Escherichia coli*, poli(tereftalato de etileno).

**Título Abrev.:** Est. Adesão e Form. de Biofilme de *E. coli* em PET e Resist. Bioc.

**Autor Correspondente:** Prof. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes – Universidade Federal da Grande Dourados – Itahum KM 12 – CEP: 79804-970 – Dourados/MS - Fone: 55 67 3410 2334. E-mail: kellybrabes@ufgd.edu.br

## ABSTRACT

Understanding the concept of biofilms and aspects of its structure and composition, are 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 *E. coli* wild in biofilm formation in ethylene terephthalate surface (PET), 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 both micro-organisms from the time of 4h. The sodium hypochlorite did not show effectiveness in reducing population of planktonic and adhered cells than other sanitizers. The biofilm to wild *E.coli* was sensitive to all concentrations of Quaternary Ammonium and inhibited growth up to a concentration of 0,002 mg/L lactic acid, while for Chlorhexidine digluconate showed growth in all concentrations. *E. coli* ATCC 25922 was sensitive only to the lower concentrations of Quaternary Ammonium, Lactic Acid and Chlorhexidine digluconate.

**Palavra-chave:** *Escherichia coli.*; biofilm; ethylene terephthalate; sanitizers.

## 1 INTRODUÇÃO

*Escherichia coli*, faz parte de um grupo de bactérias Gram-negativas que pode viver livre no ambiente ou formar biofilme (Tschowri et al, 2012). Biofilmes são células microbianas que se desenvolvem em uma superfície inseridos por uma matriz extracelular (Donlan, 2002) e representam risco potencial de contaminação em ambientes de processamento de alimentos (Stepanovic et al., 2004).

Células em biofilme são mais resistentes a antimicrobianos, como detergentes e cloro, usados em indústrias de alimentos (Watnick e Kolter, 2000). 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 (Borges et al., 2013), a matriz extracelular que serve de barreira e impede que o agente tóxico chegue às camadas mais profundas do biofilme (Królasik et al., 2010) e no caso de bactérias Gram-negativas está atribuída a membrana externa, capaz de conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (Boari et al., 2009).

Superfícies hidrofóbicas como os plásticos, facilitam a adesão microbiana comparada a superfícies hidrofílicas (Rodrigues et al., 2009). Além disso, as propriedades físico-químicas da superfície podem influenciar na adesão inicial e resistência dos micro-organismos, tanto quanto sua estrutura e composição (Gharechahi et al., 2012).

Em virtude disso, um fator preocupante para as indústrias é a higienização dos galões retornáveis de água mineral. Por isso, é de grande importância avaliar a eficácia de sanitizantes químicos como antimicrobianos frente a possível formação de biofilme em poli(tereftalato de etileno), PET, em função do pH.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização dos micro-organismos avaliados

Os micro-organismos utilizados para foram *E. coli* ATCC 25922, cedida pela Fundação André Tosello, e isolado de *E. coli* selvagem 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 h. Após o primeiro ciclo de ativação, 1 mL da cultura foi transferida para outro tubo contendo 9 mL de caldo BHI e incubado novamente a 37 °C por 24 h (COSTERTON et al., 1999; LEE et al., 2007).

### 2.3 Preparo dos cupons de poli(tereftalato de etileno), PET

O 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, lavados com detergente neutro e água corrente. Após, foram expostos à luz UV no comprimento de onda de 260 nm, por 15 min e autoclavados a 121 °C por 15 min (Hall-Stoodley et al., 2004; Parizzi et al., 2004).

#### 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 ressuspensa e incubadas a 37 °C por 256 horas, sem troca do meio de cultura durante o período de incubação (Costerton, 1999; Steven et al., 2011; Zobell, 1943). A avaliação da adesão e formação de biofilme foi realizada nos tempos de contato, sendo eles, tempos 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 32 h, 64 h, 128 h e 256 h, totalizando 11 dias, sendo que uma família de três a quatro pessoas utiliza um galão de 20 L entre 10 e 15 dias.

O tempo 0 (zero) correspondeu à análise logo após a imersão dos cupons de prova no meio de cultura juntamente com a suspensão bacteriana, afim de avaliar a possível interação do micro-organismo com a superfície neste primeiro momento (Characklis, 1973; Donlan, 2002).

A cada tempo analisado, os cupons foram retirados com o auxílio de uma pinça esterilizada, 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 rinsados manualmente durante 15 min no 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  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ , plaqueados as quatro últimas diluições pela técnica de por Plate Count Agar (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 (Costerton, 1999; Zobell, 1943).

A mesma técnica de diluição e contagem de células viáveis foram realizadas 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 Usiquímica® (HS), 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 fórmula de Henderson-Halssselbach conforme apresentado abaixo; o Quaternário de Amônia Veros® (QA) um desinfetante de Cloreto de Benzalcônico; o Digluconato de Clorexidina 20% Fagron® (DC) e o Ácido Lático Mapric® (AL). As concentrações das soluções utilizadas e valores de pH de cada sanificante (Andrade e Macêdo, 1996) são apresentadas na Tabela 1.

Equação de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{mg/L de HClO} = \text{mg/L de cloro residual livre} / (1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}})$$

**Tabela 1.** Sanificantes testados em função da concentração e pH.

<b>Sanificante</b>	<b>Concentrações</b>	<b>pH</b>
<b>Quaternário de Amônia</b>	0,048 mg/L	9,60
	0,024 mg/L	9,62
	0,012 mg/L	10,02
	0,006 mg/L	10,25
	0,003 mg/L	10,37
	0,0015 mg/L	10,00
	0,0075 mg/L	10,22
<b>Ácido Lático</b>	0,020 mg/L	2,25
	0,010 mg/L	2,58
	0,005 mg/L	3,00
	0,0025 mg/L	3,12
	0,002 mg/L	3,24
	0,001 mg/L	3,20
	0,0005 mg/L	3,62
<b>Digluconato de Clorexidina</b>	0,020 mg/L	5,45
	0,015 mg/L	6,06
	0,010 mg/L	6,00
	0,008 mg/L	6,37
	0,004 mg/L	6,17
	0,003 mg/L	6,25
	0,001 mg/L	5,24
<b>Hipoclorito de Sódio</b>	500 mg/L	6,95
	400 mg/L	7,08
	300 mg/L	7,02
	250 mg/L	7,32
	200 mg/L	7,31
	100 mg/L	7,11
	50 mg/L	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, *Escherichia coli* ATCC 25922 e selvagem foram reativadas em Caldo BHI, dupla concentração e incubadas a 37 °C por 24 h. O inóculo dos tubos foi estriado em placas previamente preparadas de Agar MacConkey. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 h. 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,  $1,5 \times 10^8$ .

A CIM para células planctônicas foi adaptado e determinado 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) (Rossi, 2008).

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 de número 9, considerado o controle negativo (BHI + antimicrobiano). O tubo de número 10 considerado o controle positivo (BHI + inóculo). Os tubos foram homogeneizados e incubados a 35 °C por 24 h (Rossi, 2008).

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

### 2.5.2 Resistência de células aderidas a sanificantes

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

A diluição dos sanificantes foram às mesmas adotadas para células planctônicas. Porém, em substituição da suspensão bacteriana ajustada para a escala de MacFarland usada como inóculo, os cupons aderidos com o biofilme estabelecido de 8 h foram adicionados a 2 mL de caldo BHI dupla concentração diluído com os sanificantes e incubados a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação os cupons foram retirados, adicionados a 10 mL de solução tampão fosfato e rinsados por 5 min no vórtex. A mesma técnica de diluição e plaqueamento foi realizada para a obtenção do número de células viáveis.

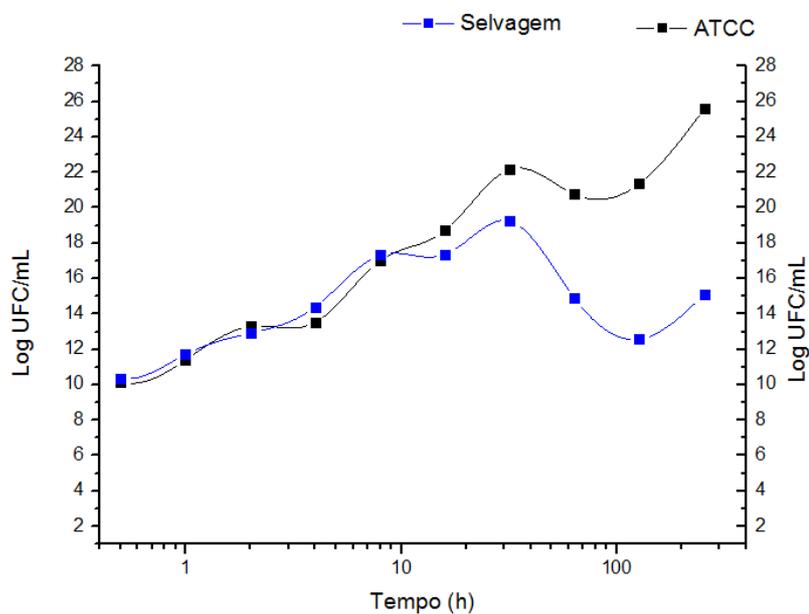
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Avaliação da multiplicação de *Escherichia coli* planctônica e em biofilme

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

Na figura 1 observa-se que no tempo inicial de 0 h (zero), *E. coli* ATCC 25922 apresentou 10,04 Log UFC/mL e a selvagem 9,84 Log UFC/mL, população suficiente para iniciar o processo de adesão. A quantidade de população ativa nos tempos de 8 h e

32 h de *E. coli* ATCC 25922 foi de 13,94 Log UFC/mL e 16,38 Log UFC/mL, para selvagem foi de 15,55 Log UFC/mL e 17,48 Log UFC/mL.

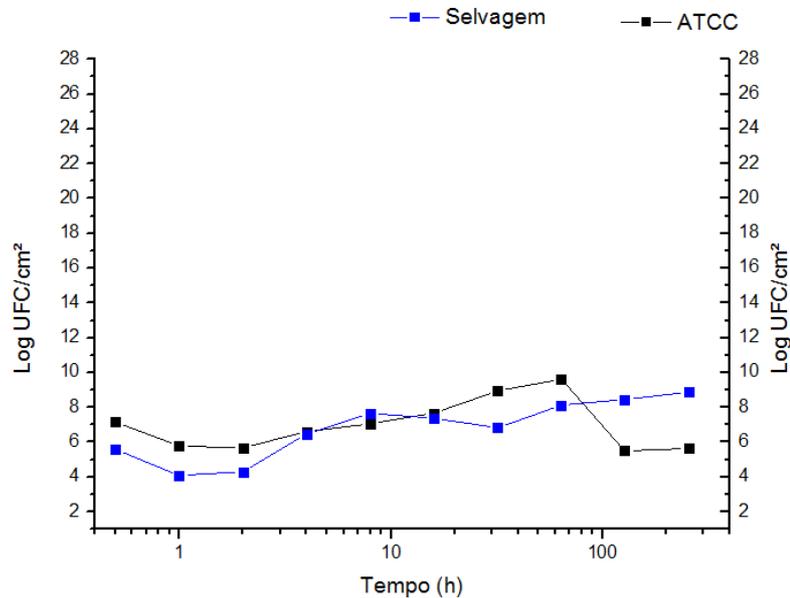


**Figura 1:** Avaliação do Crescimento Bacteriano das células planctônicas em Log UFC/mL de *E. coli* ATCC 25922 e Selvagem.

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 (Pompermayer e Gaylarde, 2000; Oulahal et al., 2008; Donlan e Costerton, 2002).

A adesão bacteriana em função do tempo de contato pode ser observada na figura 2. *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* selvagem que iniciou com 4,51 Log UFC/cm<sup>2</sup>, porém apresentou ciclos de desenvolvimento bacteriano mais definidos, apresentando

crescimento em todos os períodos avaliados em relação a população inicial, confirmando que o tempo influencia no aumento populacional de células.



**Figura 2:** Avaliação do Crescimento Bacteriano das células aderidas em Log UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli* ATCC 25922 e Selvagem à superfície de PET.

Em estudos realizados por Gândara e Oliveira (2000), o tempo de contato também demonstrou influência sobre a adesão de *Streptococcus thermophilus* na superfície de aço inoxidável. Após 3 horas a adesão média foi de  $1,6 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup> e após 6 horas de  $1,9 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>.

No tempo de 0 h até o tempo de 2 h, a *E. coli* selvagem teve população inferior a  $10^6$  e  $10^7$  Log UFC/cm<sup>2</sup>, sendo que valores abaixo disso, caracteriza apenas uma indicação de formação de biofilme (Zottola e Sasahara, 1994). Contudo, houve interação do micro-organismo com a superfície, pois, nestes tempos, a quantidade de células planctônicas era suficiente para iniciar a adesão.

A multiplicação microbiana de *E. coli* tem sido observado em diferentes superfícies, como policloreto de vinila, aço inoxidável e polietileno (Ban et al., 2012; Ryu e Beuchat, 2005; Terada et al., 2012). Pois, nenhum material é eficaz na prevenção da adesão microbiana e a característica do material influencia e facilita esse processo (Tunney, 1999; Donlan, 2001; Gharechahi et al., 2012).

A partir dos dados da multiplicação bacteriana, representada nas Figuras 1 e 2 e considerando que as bactérias podem aderir a superfícies de PET antes de 24h (Le Magrex-Debar et al., 2000), o tempo de 8 h foi escolhido como controle. Além disso, por 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, *E. coli* selvagem foi sensível a todas as concentrações de QA, apresentando halos de inibição entre 10 mm a 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 Ácido Lático.

**Tabela 2.** Perfil Antimicrobiano de *E. coli* ATCC 25922 e Selvagem Planctônicas a Sanificantes pelo Método de Disco-Difusão.

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

Apesar de *E. coli* nas duas condições apresentar sensibilidade a todas as concentrações de DC testadas, 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 que 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 Selvagem planctônica exposta a Sanificantes.

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

Quando exposta ao DC, a selvagem foi mais resistente, apresentando inibição de crescimento a partir da concentração de 0,015 mg/L. Enquanto que a ATCC 25922 foi resistente apenas a 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

Estudos tem enfatizado a formação de biofilme em superfícies enquanto outros, uma maneira de penetrar nas camadas de biofilme com o intuito de eliminá-los (Abushelaibi et al., 2012). 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. Desta forma, para se avaliar a presença de células viáveis, foi utilizada a

técnica de plaqueamento em incorporação em ágar para confirmação da multiplicação bacteriana ou a presença de resíduos de material celular.

A Figura 3 apresenta a resistência dos micro-organismos expostos aos sanificantes. *E. coli* ATCC 25922 quando exposta ao Quaternário de Amônio demonstrou menor resistência, pois apresentou crescimento em uma menor concentração do sanificante. A selvagem não apresentou crescimento em nenhuma das concentrações testadas, confirmando a ação antimicrobiana do QA, como a lise celular, morte microbiana, desnaturação de proteínas, ruptura da permeabilidade e redução da absorção de nutrientes (Simões et al., 2008; McDonnell e Russel, 1999; Cloete et al., 1998).

Observa-se que o QA foi efetivo para as células planctônicas e aderidas, tanto para ATCC 25922 quanto para selvagem. Pois não foi possível identificar crescimento microbiano da *E. coli* selvagem e apenas nas menores concentrações houve crescimento de ATCC 25922. Chmielewski e Frank (1997) ao avaliarem a eficiência do mesmo sanificante, verificaram redução populacional de *Staphylococcus aureus* aderido em diversas superfícies utilizadas na indústria de alimentos.

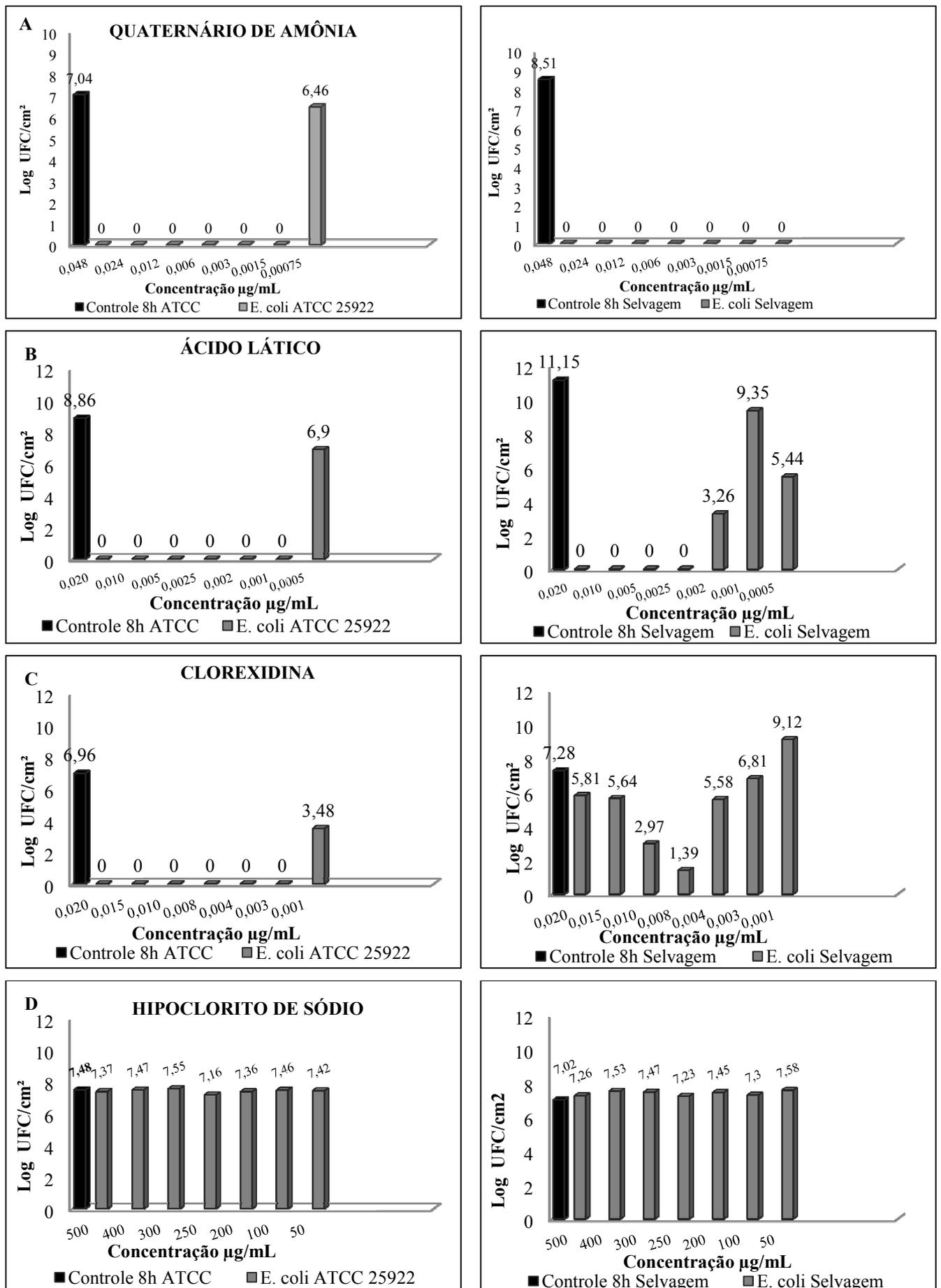
Quando exposta ao AL a ATCC 25922 apresentou menor resistência que a selvagem. O crescimento foi inibido até a concentração de 0,001 mg/L na ATCC 25922 e 0,002 mg/L na selvagem, em relação ao biofilme controle de 8h, apresentando uma redução de população nas menores concentrações do sanificante. Dentre 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 (Ban et al. 2012) e em biofilmes de duas espécies de *Enterococcus* (Arias-Molis et al., 2012).

O perfil de resistência da *E. coli* ATCC 25922 quando exposta ao DC apresentou crescimento apenas na menor concentração testada, diferente para 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 (Zanatta e Rösing, 2007).

Bonez et al. (2013), ao avaliar a atividade do DC em biofilmes de algumas bactérias e fungos, verificou menor eficiência para *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, micro-organismos que apresentaram maior resistência ao sanificante.

*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 ou uma quantidade maior de população bacteriana presente na alíquota, em relação à quantidade de sanificante contido na diluição. Para 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 (Souza e Daniel, 2005). Além disso, estudo realizado por Dukan e Touati (1996), 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.



**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 selvagem após a exposição aos sanificantes (A) Quaternário de Amônia (B) Ácido Lático (C) Digluconato de Clorexidina (D) Hipoclorito de Sódio.

## 4 CONCLUSÃO

Neste estudo, *E. coli* as duas condições testadas apresentaram capacidade de adesão a superfícies de PET. Quando expostas a sanificantes, *E. coli* selvagem e ATCC 25922 em condição de biofilme apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Este 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 que o quaternário de amônia e o ácido láctico 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 .

## 5 RESUMO

A compreensão do conceito de biofilmes e de aspectos inerentes a sua estrutura e composição, são de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias de controle e erradicação destes micro-organismos em estado sésil. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de adesão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e selvagem na formação de biofilmes em PET e descrever e avaliar a eficiência de sanificantes Quaternário de Amônia, Ácido Lático, 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 foi utilizado o método de disco-difusão e CIM (Concentração Inibitória Mínima) e para as células aderidas o teste de CIM. Os resultados obtidos indicaram formação de biofilme por ambos os micro-organismos a partir do tempo de 4h. O Hipoclorito de Sódio não apresentou eficiência na redução populacional de células aderidas e planctônicas do que os demais sanificantes testados. O biofilme de 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 Lático, enquanto que para o Digluconato de Clorexidina apresentou crescimento em todas as concentrações. *E. coli* ATCC 25922 foi sensível apenas às menores concentrações de Quaternário de Amônia, Ácido Lático e Digluconato de Clorexidina.

Palavras-chave: biofilme; sanitizantes; poli(tereftalato de etileno) (PET), *Escherichia coli*.

## 6 REFERÊNCIAS

1. ABUSHELAIBI, Aisha A.; AL SHAMSI, Mariam S.; AFIFI, Hanan S. Use of antimicrobial agents in food processing systems. *Food Nutr. Agric.*, v. 4, p. 2-7, 2012.
2. ANDRADE, Nélio José.; MACÊDO, Jorge Antônio B. Higienização na indústria de alimentos. São Paulo: Varela, 1996.
3. ARIAS-MOLIZ, M. T. et al. Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. *Medic. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal*, v. 17, n. 5, p. 902-906, 2012.
4. BAN, Ga-Hee.et al. 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.*, v. 157, p. 218-223, 2012.
5. BOARI, Cleube A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 29, n. 4, 2009.
6. BONEZ, Pauline C. et al. Chlorhedine activity against bacterial biofilms. *Am. J. Infect. Control*, 2013.
7. BORGES, Anabela. et al. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microb. Drug Resist.*, 2013.
8. CHARACKLIS W. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res.*, v. 7, p. 1249-1258, 1973.
9. CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Rev. Food Scien.Food Saf.*, v. 2, 2003.
10. CLOETE, T. E.; JACOBS, L.; BRÖZEL, VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodeg.*, v. 9, p. 23-37, 1998.
11. COSTERTON, J. W.; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, v. 284, mai., 1999.
12. DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Ver.*, v. 15, p. 167-193, 2002.

13. DONLAN, Rodney M. Biofilm: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 8, n. 9, 2002.
14. DONLAN, Rodney M. Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 7, n. 2, mar.-abr., 2001.
15. DUKAN, Sam.; TOUATI, Daniéle. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA, damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. Bacteriol.*, v. 178, n. 21, p. 6145-6150, 1996.
16. GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2000.
17. GHARECHAHI, Maryam.; MOOSAVI, Horieh.; FORGHANI, Maryam. Effect of surface roughness and materials composition on biofilm formation. *J. Biomat. Nanobiot.*, v. 3, p. 541-546, 2012.
18. HALL-STOODLEY, L. et al. Bacterial biofilms: from the natural environment infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.
19. JAHN, A.; NIELSEN, P. H. (1998). Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Science and Technology*, 37, 17-24.
20. KRÓLASIK, Joanna. et al. Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. *Pol. J. Microbiol.*, v. 59, n. 4, p. 281-287, 2010.
21. LE MAGREX-DEBAR, Elizabeth. et al. Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 55, p. 239-243, 2000.
22. LEE M. Y. et al. In vitro effectiveness of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections by *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrobial Chemot.*, v. 60, n. 4, p. 782-787, 2007.
23. MC DONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, p. 147-179, 1999.
24. OULAHAL, Nadia. et al. 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*, v. 19, p. 178-185, 2008.
25. PARIZZI, Silvânia Q. F. et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

26. POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol.*, v. 17, p. 361– 365, 2000.
27. RODRIGUES, Laura B. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. *Acta Sci. Vet.*, v. 37, n. 3, p. 225-230, 2009.
28. ROSSI, Ana Cláudia Ribeiro. **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.** 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
29. RYU, Jee-Hoon.; BEUCHAT, Larry R. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, n.1, p. 247-254, 2005.
30. SIMÕES, Manuel. et al. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 121, p. 335-341, 2008.
31. SOUZA, J.B.; DANIEL, L.A. 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.*, v.10, n.2, p.111-117, 2005.
32. STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 38, p. 428-432, 2004.
33. STEVEN, L. et al. Introduction to Biofilms. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2011.
34. TERADA, Akihiko. et al. The effect of surface charge property on *Escherichia coli* initial adhesion and subsequent biofilm formation. *Biotechnol. Bioengin.*, v. 109, n. 7, 2012.
35. TSCHOWRI, N.; LINDENBERG, Sandra.; HENGGE, Regine. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *Escherichia coli*. *Molec. Microbiol.*, v. 85, n. 5, p. 893-906, 2012.
36. TUNNEY, M. M. et al. Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. *Methods Enzymol.*, p. 558-566, 1999.

37. WATNICK, Paula; KOLTER, Roberto. Biofilm, City or Microbes. *J. Bacteriol.*, v. 183, n. 10, p. 2675-2679, 2000.
38. WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.C. What are bacterial extracellular polymeric substances?. *Microbial extracellular polymeric*, p. 1-19, 1999.
39. ZANATTA, Fabrício B.; RÖSING, Cassiano K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A*, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.
40. ZOBELL, Claude. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.*, v. 46, n. 1, p. 39-56, 1943.
41. ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing. Should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.*, v. 23, 125-148, 1994.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Micro-organismos em biofilme são responsáveis por problemas na indústria como a contaminação de equipamentos e de alimentos. *E. coli* é considerado um micro-organismo com capacidade de formação de biofilme em diversas superfícies, apresentando adesão também em PET.

Células em biofilme apresentam um modo de vida diferenciado em relação a células planctônicas, principalmente, à resistência a antimicrobianos. Em função disso e do potencial dos biofilmes como fonte crônica de contaminação microbiana, vários estudos têm sido direcionados a combatê-los e a utilização de agentes antimicrobianos tem demonstrado eficácia na redução ou remoção dessa comunidade microbiana.

O perfil antimicrobiano para células planctônicas pelo método de disco-difusão, o Quaternário de Amônia e o Digluconato de Clorexidina apresentaram eficiência para *E. coli* selvagem, apresentando halos de inibição em todas as concentrações. Quando exposta ao Ácido Lático apresentou crescimento apenas nas menores concentrações. *E. coli* ATCC 25922 apresentou crescimento nas menores concentrações de Quaternário de Amônia e inibição apenas nas duas concentrações maiores de Ácido Lático, 0,020 e 0,010 mg/L. Tanto *E. coli* selvagem e ATCC 25922 foram resistentes ao Hipoclorito de Sódio.

A avaliação de resistência pela Concentração Inibitória Mínima de células planctônicas, *E. coli* ATCC 25922 apresentou maior resistência que selvagem para o Quaternário de Amônia e Ácido Lático da mesma forma que pelo método de disco-difusão, pois apresentou crescimento em concentrações menores do sanificante. Para o Digluconato de Clorexidina e Hipoclorito de Sódio selvagem foi mais resistente.

A Concentração Inibitória Mínima em biofilme, os melhores resultados foram obtidos pelo Quaternário de Amônia e Ácido Lático para *E. coli* ATCC 25922 e selvagem. O Digluconato de Clorexidina foi eficaz para a ATCC 25922. O Hipoclorito de Sódio não foi eficiente para nenhum dos micro-organismos.

## 6 REFERÊNCIAS

1. ABUSHELAIBI, Aisha A.; AL SHAMSI, Mariam S.; AFIFI, Hanan S. Use of antimicrobial agents in food processing systems. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, v. 4, p. 2-7, 2012.
2. AGARWAL, G. et al. In vitro efficacy of ciprofloxacin and gentamicin against a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and its free-living forms. *The National Medical Journal of India*, v. 18, n. 4, p. 184-186, 2005.
3. AKUTSU, Cleusa K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado.** 2001. 84f. Tese – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2001.
4. ANAND, Rajat.; RAI; Navneet.; THATTAI, Mukund. Interactions among quorum sensing inhibitors. *Plos. One*, v. 8, n. 4, 2013.
5. ARCIOLA, Carla R. et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. a review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, v. 33, p. 5967-5982, 2012.
6. ARIAS-MOLIZ, M. T. et al. Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal*, v. 17, n. 5, p. 902-906, 2012.
7. BAN, Ga-Hee.et al. Synergistic effect of steam and lactic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, v. 157, p. 218-223, 2012.
8. BARNES, Ronald; CASKEY, Kevin. Using Ozone in the prevention of bacterial biofilm formation and scaling. *Water Conditioning e Purification*, 2002.
9. BELOIN, Christophe.; ROUX; Agnés.; GUIGO, Jean-Marc. *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 322, p. 249-289, 2008.
10. BOARI, Cleube A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 4, 2009.
11. BONEZ, Pauline C. et al. Chlorhedine activity against bacterial biofilms. *American Journal of Infection Control*, 2013.

12. BORGES, Anabela. et al. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 2013.
13. BRABES, Kelly C. da S. **Identificação e capacidade de adesão de Staphylococcus spp. isolados de manipuladores, superfícies e ar de ambientes de uma indústria de laticínios.** 2005. 83f. Tese – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
14. BRANDA, Steven S. et al. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, v. 13, 2005.
15. BRASIL, Portaria nº 358, de 22 de setembro de 2009. **Departamento Nacional de Produção Mineral.** Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSecao=67&IDPagina=84&IDLegislacao=574>> Acesso em: 16 de junho de 2013.
16. BRASIL, Portaria nº 358, de 22 de setembro de 2009. **Departamento Nacional de Produção Mineral.** Disponível em: <[http://www.dnpm.gov.br/mostra\\_arquivo.asp?IDBancoArquivoArquivo=3151](http://www.dnpm.gov.br/mostra_arquivo.asp?IDBancoArquivoArquivo=3151)> Acesso em: 16 de junho de 2013.
17. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 173, de 13 de setembro de 2006. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e de Água Natural e a Lista de Verificação das Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água.
18. BRASIL. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Disponível em: <<http://www.pragas.com.br/legislacao/bancodedados/port15-88.php>>. Acesso em: 10 de outubro de 2013.
19. BRYERS, James. RATNER, Buddy D. Biomaterials approaches to combating oral biofilms and dental disease. *BMC Oral Health*, v. 6, 2005.
20. CAIXETA, Daniela S. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two Pseudomonas species on stainless steel surface. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 32, n. 1, p. 142-150, 2010.
21. CARDOSO, Claudia C. et al. Avaliação microbiológica de um processo de sanitização de galões de água com a utilização de ozônio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 59-61, 2003.
22. CARELI, Roberta. et al. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 1, p. 171-176, 2009.

23. CHARACKLIS W. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*, v. 7, p. 1249-1258, 1973.
24. CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 2, 2003.
25. CLOETE, T. E.; JACOBS, L.; BRÖZEL, VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*, v. 9, p. 23-37, 1998.
26. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Informational Supplement. M100-S22. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, v. 32, n. 3, 2012.
27. COSTERTON, J. W.; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. P.. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections *Science*, v. 284, mai., 1999.
28. DENG, Dong Mei. et al. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 9, 2009.
29. DIAS, Nayane A. A. et al. Avaliação da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* através de eletromicrografia de varredura em cupons de náilon e poliestireno. In: XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 2010, Lavras. *Anais...Lavras: 2010*.
30. DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review*, v. 15, p. 167-193, 2002.
31. DONLAN, Rodney M. Biofilm: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, 2002.
32. DONLAN, Rodney M. Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerging Infectious Diseases*, v. 7, n. 2, mar.-abr., 2001.
33. EGUCHI, J.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. *Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação*, n.22, p.35-39, 2007.
34. FALCONE DIAS, Maria Fernanda.; FARACHE FILHO, Adalberto. Quantitative variations in heterotrophic plate count and in the presence of indicator microorganisms in bottled mineral water. *Food Control*, v. 31, p. 90-96, 2013.
35. FARDAK, O.; TURNBULL, R. A review of literature on use of chlorhexidine in dentistry. *Journal Am. Dent. Assoc.*, v. 112, p. 863-869, 1985.

36. FERRIÉREZ, Lionel.; HANCOCK, Viktoria.; KLEMM, Per. Biofilm exclusion of utopathogenic bacteria by selected asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains. *Microbiology*, v. 153, p. 1711-1719, 2007.
37. FLEMMING, Hans-Curt.; NEU, Thomas R.; WOZNIAK, Daniel J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 22, 2007.
38. FRANK, J. F. CHMIELEWSKI, R. A. N. Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. *Journal Food Prot.*, v. 60, n. 1, p. 1–6, 1997.
39. GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2000.
40. GEESEY, G. G.; MUTCH, R.; COSTERTON, J.W. Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams. *Limnol. Oceanogr.*, v. 23, n. 6, p. 1214-1223, 1978.
41. GHARECHAHI, Maryam.; MOOSAVI, Horieh.; FORGHANI, Maryam. Effect of surface roughness and materials composition on biofilm formation. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v. 3, p. 541-546, 2012.
42. GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87, p. 41-48, 1999.
43. GUTIÉRREZ, Diana. et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied Environmental Microbiology*, v. 78, n. 24, 2012.
44. HALL-STOODLEY, L. et al. Bacterial biofilms: from the natural environment infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.
45. HAMMER, Brian K.; BASSLER, Bonnie L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 101-114, 2003.
46. HAÜSSLER, S.; PARSEK, M. R. Biofilms 2009: New perspectives at the heart of surface-associated microbial communities. *Journal Bacteriology*, 2010.
47. JAHN, A.; NIELSEN, P. H. (1998). Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Science and Technology*, 37, 17–24.

48. JOHNSON, Leah R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, v. 25, n. 1, p. 24-34, 2008.
49. JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 367-372, 2001.
50. KASNOWSKI, Maria Carmela. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 8, n. 15, 2010.
51. KONG, Kok-Fai.; VUONG, Cuong.; OTTO, Michael. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, p. 133-139, 2006.
52. KRÓLASIK, Joanna. et al. Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. *Polish Journal of Microbiology*, v. 59, n. 4, p. 281-287, 2010.
53. LASA, I. et al. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.*, v. 28, n. 2, p. 163-175, 2005.
54. LAZAR, Veronica. Quorum sensing in biofilms – How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/Power? *Anaerobe*, v. 17, p. 280-285, 2011.
55. LE MAGREX-DEBAR, Elizabeth. et al. Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *International Journal of Food Microbiology*, v. 55, p. 239-243, 2000.
56. LECLERC, H.; DA COSTA, M. S. The microbiology of natural mineral waters. In: SENIOR, D. A. G.; ASHURST, P. R. (Ed.) **Technology bottled water**. Sheffield: Academic, p. 223-274, 1998.
57. LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms with in the clinical setting: what health care professional should know. *Journal of Hospital Infection*, v. 64, p. 313-325, 2006.
58. LIU, Yu.; TAY, Joo-Hwa. Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 17, p. 111-117, 2001.
59. LÓPEZ, Daniel. et al. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, n. 7, 2010.
60. MARQUES, Simone C. et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 538-543, 2007.

61. MARRIOTT, Norman G.; GRAVANI, Robert B. **Principles of Food Sanitation**. Food Science Texts Series, 2006.
62. MC DONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Review*, v. 12, p. 147-179, 1999.
63. MICHU, Elleni. et al. Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of *ica*-mediated biofilms. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 179-184, 2011.
64. Mineral Natural e de Água Natural. **ANVISA Publicações Eletrônicas**. 2006. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0a5312004745899c93b3d73fbc4c6735/RDC+n%C2%BA+173.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 15 de junho de 2013.
65. MITRA, Arindam. et al. Pleiotropic roles of *uvrY* on biofilm formation, motility and virulence in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Plos One*, v. 8, n. 2, 2013.
66. MIYAGI, Fumie.; TIMENETSKY, Jorge.; ALTERTHUM, Flávio. Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n. 5, p. 444-448, 2000.
67. MYSZKA, Kamila; CZACZYK, Katayna. Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 61, n.3, p. 173-180, 2011.
68. NAIDU, A. S., BIDLACK, W. R., CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, v. 38, p. 13-126, 1999.
69. NYENJE, Mirriam E.; GREEN, Ezekiel.; NDIP, Roland N. Biofilm formation and adherence characteristics of *Listeria ivanovii* strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa, *The Scientific World Journal*, 2012.
70. OLIVEIRA, Máira M. M. de. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 69, n. 3, p. 266-284, 2010.
71. OLIVEIRA, Máira M. M. de. et al. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em cultivo estático e sob agitação. In: XX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA, 2011, Lavras. *Anais...* Lavras: 2011.
72. OULAHAL, Nadia. et al. 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*, v. 19, p. 178-185, 2008.

73. PAN, Y.; BREIDT JR., F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 7711-7717, 2006.
74. SKANDAMIS, Panagiotis N.; NYCHAS, George John E. *Quorum Sensing* in the Context of Food Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 16, 2012.
75. PARIZZI, Silvânia Q. F. et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.
76. PENG, J. S. et al. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology*, v. 77, p. 11-18, 2002.
77. POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*, v. 17, p. 361– 365, 2000.
78. POPAT, Roman. et al. The social behaviours of bacterial pathogens. *British Medical Bulletin*, v. 87, p. 63-75, 2008.
79. POULSEN, Lena V. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. – Wiss. u.-Technol.*, v. 32, p. 321-326, 1999.
80. PRATT, Lesile A.; KOLTER, Roberto. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, v. 30, n. 2, p. 285-293, 1998.
81. RITTER, Ana C.; TONDO, Eduardo C. Avaliação microbiológica de água mineral natural e de tampas plásticas utilizadas em uma indústria da grande Porto Alegre/RS. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 20, n. 2, p. 203-208, 2009.
82. RODRIGUES, Laura B. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 3, p. 225-230, 2009.
83. RODRIGUES, Laura B. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughter house. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 1082-1085, 2010.

84. ROMÃO, Wanderson.; SPINACÉ; Márcia A. S.; DE PAOLI, Marco-A. Poli(Tereftalato de Etileno), PET: Uma revisão sobre os processos de síntese, mecanismos de degradação e sua reciclagem. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 2, p. 121-132, 2009.
85. ROSSI, Ana Cláudia Ribeiro. **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.** 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
86. RYU, Jee-Hoon.; BEUCHAT, Larry R. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n.1, p. 247-254, 2005.
87. SCHMIDLIN, Patrick R. et al. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with surface characteristics. *Journal Applied Oral Science*, v. 21, n. 1, p. 48-55, 2013.
88. SIMÕES, Manuel.; SIMÕES, Lúcia C.; VIEIRA, Maria J. A review of current and emergente biofilm control strategies. *Food Science and Technology*, v. 43, p. 573-583, 2010.
89. SIMÕES, Manuel; SIMÕES, Lúcia C.; VIEIRA, Maria J. Species association in creases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*, v. 43, p. 229-237, 2009.
90. SIMÕES, Manuel. et al. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, v. 121, p. 335-341, 2008.
91. STEPHENS, Craig. Microbiology: Breaking Down Biofilms. *Current Biology*, v. 12, p. 132-134, 2002.
92. STEVEN, L. et al. Introduction to Biofilms. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2011.
93. STEVENSON, Gordon. et al. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 16, p. 4885-4893, 1996.
94. STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. V. 56, p. 189-209, 2002.
95. SUNTHARALINGAM, Prashanth; CVITKOVITCH, Dennis G. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 1, 2005.

96. TAKENAKA, S. et al. Adaptation of *Pseudomonas* sp. strain 7-6 to quaternary ammonium compounds and their degradation via dual pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 6, 2007.
97. TERADA, Akihiko. et al. The effect of surface charge property on *Escherichia coli* initial adhesion and subsequent biofilm formation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 7, 2012.
98. TRACHOO, Nathanon. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, v. 25, n. 6, 2003.
99. TSCHOWRI, N.; LINDENBERG, Sandra.; HENGGE, Regine. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, v. 85, n. 5, p. 893-906, 2012.
100. TUNNEY, M. M. et al. Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. *Methods Enzymol.*, p. 558-566, 1999.
101. TYERMAN, Jabus G. et al. The evolution of antibiotic susceptibility and resistance during the formation of *Escherichia coli* biofilms in the absence of antibiotics. *BMC Evolutionary Biology*, v. 13, n. 22, 2013.
102. VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal Applied Microbiology*, 2010.
103. VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiololy*, v. 156, p. 626–633, 2005.
104. VIDAL, D. R.; RAGOT, C.; THIBAUT, F. Bacterial biofilmes and resistance to disinfectants. *Annales Pharmaceutiques Françaises.*, v. 55, n. 2, p. 49-54, 1997.
105. WATNICK, Paula; KOLTER, Roberto. Biofilm, City or Microbes. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 10, p. 2675-2679, 2000.
106. WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.C. What are bacterial extracellular polymeric substances?. *Microbial extracellular polymeric*, p. 1-19, 1999.
107. XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, n. 76, p. 2-13, 2003.

108. XU, He. et al. Characterizing pilus-mediated adhesion of biofilm-forming *E. coli* to chemically diverse surfaces using atomic force microscopy. *Langmuir*, v. 23, p. 3000-3011, 2013.
109. ZANATTA, Fabrício B.; RÖSING, Cassiano K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A*, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.
110. ZEIGER, Diana N. et al. Effects of sample preparation on bacterial colonization of polymers. *Langmuir*, v. 26, n. 4, p. 2659-2664, 2010.
111. ZOBELL, Claude. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, v. 46, n. 1, p. 39-56, 1943.
112. ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing. Should they be a concern? *International Journal Food Microbiology*, v. 23, 125-148, 1994.

## **ANEXOS**

**ANEXO A** – Laudo Técnico do Sanificante Veros®

**ANEXO B** – Laudo Técnico do Sanificante Ácido Lático 85% Mapric®

**ANEXO C** – Laudo Técnico do Sanificante Hipoclorito de Sódio Usiquímica®

**ANEXO D** - Laudo Técnico do Sanificante Digluconato de Clorexidina Fagron®

**ANEXO E** – Normas da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências para publicação de artigo.

## ANEXO A – Laudo Técnico do Sanificante Veros®

### 01 – IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

#### 1.1) Nome Comercial VEROSPLUSBIGUAQUATER

**1.2) Nome do Produto** Desinfetante à base de biguanida com quaternário de amônia (cloreto benzalcônico).

**1.3) Fórmula Química** Cloridrato de Biguanida Polimérica, Cloreto Alquil Dimetil Benzil Amônio, sequestrante e água

**1.4) CAS** Não aplicável.

**1.5) Suporte ao Médico** PRÓ-QUÍMICA / ABIQUIM – Fone: 0800 11 8270

**1.6) Dados do Fabricante** VEROS PRODUTOS QUIMICOS LTDA  
E-mail: [veros@uol.com.br](mailto:veros@uol.com.br) Fone: (11) 2345-5077 / 2347-1677

CNPJ: 43.805.456/0001-31

Av. Prof. Luis Ignácio de Anhaia Mello, n. 1268 Vila Prudente  
São Paulo/SP - CEP 03154-100

CNPJ: 43.805.456/0003-01

Rua Itajubá, 495 – Cidade Industrial Guarulhos/SP - CEP 07222-030

### 2 – IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

#### Rotas (vias) de exposição

Pele: não há absorção

Ingestão: evitar.

Olhos: o contato pode causar irritações

### 3 – COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÕES SOBRE INGREDIENTES Nº CAS

#### - Nome Químico

20783-27-8 Cloridrato de Biguanida Polimérica

8001-54-5 Cloreto Alquil Dimetil Benzil Amônio (cloreto de benzalcônio)

### 04 – MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

Pessoas alérgicas ao produto devem evitar seu uso. Não dê nada por via oral a uma pessoa inconsciente.

**Ingestão:** Em caso de ingestão, não provoque vômito e consulte imediatamente um médico ou o Centro de Intoxicações (CEATOX 0800-722-6001), levando o rótulo do produto.

**Olhos:** Em caso de contato com os olhos, lave-os imediatamente com água corrente em abundância. Se os sintomas persistirem, procure auxílio médico.

**Pele:** Não causa irritação cutânea; porém, evitar o contato direto com a pele.

## **05 – MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO**

### **Fogo / Incêndio / Explosão**

Não é inflamável. Não apresenta riscos de explosão.

### **Procedimentos em caso de incêndio**

Usar água para resfriar recipientes aquecidos, se estiverem expostos ao fogo.

## **06 – MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU**

**VAZAMENTO Precauções pessoais:** utilizar os equipamentos de proteção individual (EPIs) indicados.

**Precauções ao meio ambiente:** não permitir que o vazamento atinja rios, lagos e mananciais.

Diluir os restos do produto com água e proceder a eliminação de acordo com a legislação local vigente. Manter o ambiente ventilado. Remover todas as fontes de ignição.

## **07 – MANUSEIO E ARMAZENAMENTO**

- O produto não oferece risco em seu manuseio.
- Manter o produto em sua embalagem original, fechada, em local seco, ventilado, ao abrigo da luz solar direta e longe de fontes de calor.
- Manter as embalagens na posição vertical e afastadas de crianças e animais domésticos.
- Nunca furar a embalagem e não reutilizar nem incinerar a embalagem, mesmo depois de vazia.

## **08 – CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL**

Usar equipamento de proteção individual como: luvas, botas, avental e óculos de proteção.

## **09 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

**Estado físico:** Líquido.

**Cor:** Incolor.

**Odor:** Inodoro.

**Densidade:**  $1,05 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$

**pH puro:** 7,0 a 7,8

**Solubilidade:** Solúvel em água quente ou fria, alcoóis alifáticos, glicóis, éteres glicóis. Insolúvel em hidrocarbonetos e solventes aromáticos.

**Concentração:** Solução aquosa de cloridrato de biguanida polimérica (6,3%) e cloreto de benzalcônio (2,6%).

## 10 – ESTABILIDADE E REATIVIDADE

**Estabilidade:** Estável na embalagem original lacrada, em temperaturas normais de armazenagem.

Não é inflamável.

Quimicamente estável e não volátil.

Compatível com detergentes não iônicos, ácidos e compostos de quaternário de amônio, plástico, metal etc sem risco de corrosão.

**Reatividade:** Reage com tensoativo aniônico e soluções e contaminantes fortemente alcalinos ou ácidos, formando precipitados e perdendo atividade desinfetante.

**Incompatibilidade:** Incompatível com surfactantes aniônicos e ácido nítrico. Em geral, insolúvel em hidrocarbonetos e solventes aromáticos.

## 11 – INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

### **Toxicidade sobre mamíferos**

Uma série de testes realizados comprovou que VEROSPLUSBIGUAQUATER apresenta uma baixa toxicidade em mamíferos.

DL 50 (mg / kg de peso corpóreo)

Quaternários de amônio                      450

Verosplusbiguaquater                      5.000

## 12 – INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

É um produto facilmente absorvido nos processos de tratamento de resíduos.

Testes de laboratório indicam que por se tratar de princípios ativos catiônicos, seu efeito no tratamento de afluentes aeróbicos não é sério no caso de uma dosagem contínua de 140 ppm na alimentação do sistema.

No caso de ingestão anaeróbica, os testes mostram que 50 ppm em alimentação contínua no digestor pode ser tolerada.

Os recipientes são fabricados com material reciclável e podem ser eliminados sem nenhum problema, pois contêm resíduos de baixa toxicidade.

## 13 – CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

Não deixa resíduo químico tóxico.

Os resíduos deverão ser dispostos conforme especificado pelo Órgão de Controle Ambiental Local.

## 14 – INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE

Não é produto químico classificado.

## 15 – REGULAMENTAÇÕES

- Resolução 420/04 ANTT – Instr. complementares ao RTPP classif. e relação dos produtos perigosos.

- o *Alterada pela Resolução 701 de 25/08/2004*
- o *Alterada pela Resolução 1644 de 26/09/2006*
- o *Alterada pela Resolução 2657 de 15/04/2008*
- o *Alterada pela Resolução 2975 de 18/12/2008*
- o *Alterada pela Resolução 3383 de 20/01/2010*
- o *Alterada pela Resolução 3763 de 26/01/2012*
- o *Alterada pela Resolução 3632 de 09/02/2011*
- o *Alterada pela Resolução 3648 de 16/03/2011*

NBR-7500-2003 – Identificação para o transporte terrestre, manuseio, movimentação e armazenamento. NBR-14725 – Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ.

- GHS – 2011 -Sistema de Classificação de Produtos Perigosos.

## 16 – OUTRAS INFORMAÇÕES

- Para informações específicas sobre o produto entre em contato:

Telefone: (11) 2347-1677, Fax: (11) 2345-6825, E-mail: veros@uol.com.br

Telefones de emergência (24 horas):

Pro-Química / Abiquim: 0800 11 8270

Bombeiros / resgate: 193 (incêndios, vazamentos, emergências)

- O produto só deve ser utilizado para as aplicações mencionadas em sua embalagem.
- Como as condições específicas de utilização do produto estão fora do controle do fornecedor, o usuário é responsável por garantir que as legislações locais sejam seguidas.
- As informações contidas nesta ficha de informação de segurança e produto químico estão baseadas nos conhecimentos, experiência técnica, legislação atuais e na composição de risco.
- Os compradores não ficam isentos de testes e experiências próprias, tendo em vista o grande número de Influências (estímulos) que possam eventualmente surgir no processo de transformação e aplicação de nossos produtos. Estas informações implicam numa garantia legal quanto a determinadas propriedades de adequação do produto para um uso específico.
- Eventuais infrações de direitos de proteção, bem como de leis e normas vigentes serão de inteira e exclusiva responsabilidade do comprador.

# ANEXO B – Laudo Técnico do Sanificante Ácido Lático 85% Mapric®



## CERTIFICADO DE ANÁLISE

### AC. LÁTICO 85%

Lote: AUTO069-66  
 Fabricação: 06/04/09  
 Validade: 05/04/14  
 Procedência: BRASIL

Origem: BRASIL  
 Lote Fabricante: 0904000396  
 Ordem Fraciona: 009727  
 Nome Fabricante: PURAC

Formula: C9H8O9  
 No DOB: 00274  
 Nomenclatura INCI: Lactic Acid  
 No CAS: 50-21-5

Peso Molecular: 90,08

Parâmetros	Especificado	Resultados
Ácidos Cítricos, Oxálico, Fosfórico e Ta	Teste	De acordo
Aparência	Líquido xaroposo	De acordo
Açúcares Redutores	Teste	De acordo
Unzas Sulfídicas	Máx. 0,1%	0,0
Cloreto	Máx. 10 ppm	De acordo
Cor	Incolor	De acordo
Densidade a 20o C (g/ml)	Entre 1,19 e 1,21	1,19
Identificação	Teste	De acordo
Metas Pesadas	Máx 20 ppm	De acordo
Odor	Agradável / Quase inodoro	De acordo
Sabor	Fortemente ácido	De acordo
Solubilidade	Miscível com água, álcool e éter. Não miscível com clorofórmio, benzeno e éter de petróleo.	De acordo
Substancia facilmente carbonizavel	Teste	De acordo
Teor (%)	Entre 84,50 e 85,50	84,84
Ensaio realizado pelo fabricante		
Calcio	Máx. 20 ppm	<1
Sulfato	Máx 20 ppm	<1

Monografia: FB III, Metodologia do Fabricante

Conservar bem fechado ao abrigo da luz em temperatura entre 15 - 30° C

Aprovação de acordo com as especificações descritas.

Dr. Luiz Gustavo Martins Mathias  
 Farmacêutico Bioquímico  
 CRF - SP:14.851

Dr. Rodrigo Moura  
 Farmacêutico Bioquímico  
 CRF - SP:48.730

04/03/13

Departamento técnico

Data de emissão

**Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278 080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282**  
**mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br**

ANEXO C – Laudo Técnico do Sanificante Hipoclorito de Sódio Usiquímica®

<b>USIQUIMICA</b>	<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>
-------------------	-------------------------------

PRODUTO: HIPOCLORITO DE SODIO	LOTE: 130405.1791.1
QUANTID: 1.200 KG	NOTA FISCAL: 48.212
CLIENTE: DIPOL COM.PRODS.LIMPEZA LTDA EPP	CODIGO: 79.008.7

DETERMINAÇÃO	UNIDADE	MÍNIMO	MÁXIMO	RESULTADO
CONCENTRACAO( m/m NaClO )	%	12,0	-	=>12,0
Densidade a 20 oC	g/mL	1.200	-	=>1,200
ALCALINIDADE RESIDUAL (NaOH)	g/L	3,0	8,0	Atende
FERRO	-mg/L	-	3,0	=<3,0

ASPECTO DO PRODUTO	LIQUIDO, AMARELO ESVERDEADO COM ODOR PICANTE
--------------------	--

DATA DE FABRICAÇÃO	05/04/2013	PRAZO DE VALIDADE	MELHOR CONSUMIR ATE 05/10/2013
--------------------	------------	-------------------	--------------------------------

LOTE DO FABRICANTE	DANFE: 171.914	NOME FABRICANTE	CARBOCLORO
--------------------	----------------	-----------------	------------

OUTRAS OBSERVAÇÕES	
--------------------	--

RESPONSÁVEL TÉCNICO	VALDECI J.BENEDITO	CRQ	04426244	EMISSÃO	20/05/2013
---------------------	--------------------	-----	----------	---------	------------

RUA DA LAGOA, 511 - CEP 07232-152 - TEL: (11) 2481-3355 - FAX: (11) 2481-3355 - CUMBICA - GUARULHOS - SP

ANEXO D - Laudo Técnico do Sanificante Digluconato de Clorexidina Fagron®

**FAGRON**

**CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE**

Página 5/10

Impressão 27/06/13 11:00

Autorização de Funcionamento M.S.:1.01284-7  
Aut.Especial de Funcionamento M.S.:1.20182-2

NF. 336.097 de 27/06/2013

Insumo: **DIGLUCONATO CLOREXIDINA 20%**

Lote : SMAART/CHG/2012/028#5 Origem : India Fabric : 30/04/2012  
Lote Fab: SMAART/CHG/2012/028 Procedencia : India Validade : 01/03/2016  
Formula : C34 H54 Cl2 N10 O14 PM : 898 Frac : 616834 17/06/2013  
DCB : 02437 DCI : CAS : 18472-51-0 Analise : 123289 17/06/2013

Categoria Terapeutica : **ANTIBACTERIANO**

Ensaio	Especificação	Resultado
DESCRIÇÃO	LÍQUIDO QUASE INCOLOR OU AMARELO PÁLIDO	LÍQUIDO QUASE INCOLOR
SOLUBILIDADE	MISCÍVEL EM ÁGUA	DE ACORDO
SOLUBILIDADE	MISCÍVEL EM 1:3 DE ACETONA	DE ACORDO
SOLUBILIDADE	MISCÍVEL EM 1:5 DE ETANOL 96%	DE ACORDO
IDENTIFICAÇÃO	IV-O ESPECTRO DA AMOSTRA ESTÁ DE ACORDO COM O PADRÃO	DE ACORDO
IDENTIFICAÇÃO	CCD	DE ACORDO
DENSIDADE	RELATIVA: 1,06 - 1,07 g/mL	1,07 g/mL
pH	5,5 - 7,0	5,88
4 - CHLOROANILINE	QUALQUER COR AZUL-AVERMELHADO NA SOLUÇÃO NÃO É MAIS INTENSA QUE A DO PADRÃO	DE ACORDO
SUBS.RELACIONADA	IMPUREZA TOTAL: MÁXIMO 3,0%	1,03%
DOSEAMENTO	19,0% - 21,0%	19,36%
SOLVENTE RESIDUAL	N BUTANOL: MÁXIMO 5000 ppm	4,85 ppm
SOLVENTE RESIDUAL	METANOL: MÁXIMO 3000 ppm	9,33 ppm
IDENTIFICAÇÃO	COLORIMETRICO	DE ACORDO
IDENTIFICAÇÃO	PONTO DE FUSÃO: 132°C - 136°C	DE ACORDO

MONOGRAFIA : DADOS TRANSCRITOS DO LAUDO DO FORNECEDOR QUE CUMPRE COM EP 7

NOMENCLATURA : CLORHEXIDINA DIGLUCONATO 20%

**Ficha de Segurança**

SEGURANÇA : ACONDICIONAR EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, AO ABRIGO DA LUZ, CALOR E UMIDADE

Parecer Técnico : INSUMO NA EMB.ORIGINAL DO FABR/FORN. DADOS TRANSCRITOS DO CERT.ORIGINAL

OBS: (\*)Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade FAGRON e os demais estão em conformidade com o Certif.de Análise do Fabricant

Dra. Kely Cristina de Lima Oliveira  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF-SP:52.472

0105

03/07/13

1x2 2kg

**SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA**

Rua Jurupari, 775/779/803  
Cep 04348-070

Jd. Oriental  
São Paulo - SP

Fone 11 5033-3700  
www.fagron.com.br

## ANEXO E - Normas da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências para publicação de artigo

### Instruções aos Autores

A revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS encoraja fortemente as submissões online. Uma vez o artigo preparado de acordo com as instruções abaixo, visite o site de submissão online ( <http://aabc.org.br/>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

### Objetivo e Política Editorial

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

### Tipos de Artigos

**Revisões:** Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

**Artigos:** Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introdução; 4. Materiais e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos quando necessário; 8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência); 9. Referências. Artigos de algumas áreas, como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

**Breves Comunicações:** Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas.

Os autores devem enviar seus artigos somente em versão eletrônica.

### **Preparo dos Artigos**

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada, para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

**Tamanho dos artigos:** Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

**Tabelas e ilustrações:** Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

**Figuras digitalizadas:** As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática, Física ou Química podem ser digitados em Tex, AMS-Tex ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

**Página de rosto:** A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7. Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

**Agradecimentos:** Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

**Abreviaturas:** As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

**Referências:** Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.

#### *Artigos*

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A . 1984a. Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Delandsheer E, Giuffrida R and Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

#### *Livros e capítulos de livro*

Davies M. 1947. An outline of the development of Science, *Athinker's Library*, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT . 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: National Cancer Conference , 5., Philadelphia Proceedings ..., Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W and Burke EAJ . 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2 nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody RW . 1974. Studies of theoretical circular dichroism of Polipeptides: contributions of B-turns. In: Blouts ER et al . (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

*Outras publicações*

International Kimberlite Conference , 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings ... Rio de Janeiro: CPRM, 1994., 495 p.

Siatycki J . 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 19985, 55 p. Preprint n. 600.