

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ADESÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* EM GALÕES DE
POLIPROPILENO E CONTROLE POR SANITIZAÇÃO QUÍMICA**

JOANES PEREIRA ANDRADE JUNIOR



JOANES PEREIRA ANDRADE JUNIOR

**ADESÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* EM GALÕES DE POLIPROPILENO E
CONTROLE POR SANITIZAÇÃO QUÍMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para o grau de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Roberta Torres Careli

MONTES CLAROS – MG
2021

JOANES PEREIRA ANDRADE JUNIOR

**ADESÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* EM GALÕES DE POLIPROPILENO E
CONTROLE POR SANITIZAÇÃO QUÍMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para o grau de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Roberta Torres Careli

Instituto de Ciências Agrárias da UFMG

Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Prof^ª Érika Endo Alves
ICA/UFMG

Thaís Santos Pinheiro
ICA/UFMG

Prof^ª Roberta Torres Careli
Orientadora ICA/UFMG

Montes Claros, 10 de agosto de 2021

À minha família, meu porto seguro e a razão pela qual existo.

*“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.
A ciência consiste em saber; e crer que se sabe reside a ignorância”*

- Hipócrates

RESUMO

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

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de células aderidas (log UFC/cm ²) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em superfície de polipropileno, após cinco dias a 26 °C ± 2 °C, em contato com água mineral, após diferentes tempos de contato com soluções de NaOCl e solução controle.....	16
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATTCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain Heart Infusion Broth*

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

DNPM: Departamento Nacional de Produção Mineral

DTAs: Doenças Transmitidas por Alimentos

EPS: Exopolissacarídeo

ICA: Instituto de Ciências Agrárias

NaOCl: Hipoclorito de Sódio

NMP: Número Mais Provável

PE: Polietileno

PET: Politereftalato de etileno

PP: Polipropileno

PVC: Policloreto de Vinila

TTC: Cloreto de Tetrafeniltetrazólico

UFC/cm²: Unidade Formadora de Colônia por Centímetro Quadrado

UFC/mL: Unidade Formadora de Colônia por mililitro

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1	Adesão bacteriana	12
2.2	Potencial de biotransferência	13
2.3	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima	13
2.4	Sensibilidade ao sanitizante químico	13
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4	CONCLUSÃO	17
5	REFERÊNCIAS	17

1 INTRODUÇÃO

A água envasada tem se tornado uma boa alternativa para a substituição da água de fornecimento público, uma vez que a qualidade microbiológica e sensorial desta, por muitas vezes, deixa a desejar. É notório o crescimento do consumo de água mineral engarrafada no Brasil, cujo consumo doméstico ganhou notoriedade a partir da década de 70, período em que a industrialização obteve um expansivo crescimento, principalmente na década de 90, em que os volumes envasados foram triplicados e, no ano de 2000, passaram de 800 milhões de litros para três bilhões (ASSIRATI, 2016). Este crescimento está atribuído a fatores como a carência de fontes hídricas de boas procedências e consideradas seguras, o déficit de fornecimento de água potável pelo Estado e as altas temperaturas, típicas do clima tropical e predominantes no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou artificialmente captada, de origem subterrânea, caracterizada por conteúdo definido, constante de sais minerais e outros constituintes. Além disso, não deve apresentar risco à saúde do consumidor (BRASIL, 2006). Sendo assim, deve ser captada, processada e envasada obedecendo às condições higiênico sanitárias e às boas práticas de fabricação (CARDOSO *et al.*, 2003).

Devido a água mineral ser considerada um produto de alto consumo e não passar por tratamento que elimine contaminantes biológicos, este produto deve ser acondicionado em uma embalagem que lhe confira inocuidade, qualidade sensorial e hermeticidade (EVANGELISTA, 2005). Os tipos de embalagens utilizadas para o envase do produto proporcionam um leque de opções para os consumidores, com diferentes volumes e materiais. Na indústria de embalagens para água mineral são utilizados policloreto de vinila (PVC), polietileno (PE), politereftalato de etileno (PET) e polipropileno (PP). Estas embalagens apresentam facilidade no manuseio e transporte, baixo custo, evitam ferrugens, possuem leveza, são recicláveis e apresentam funcionalidade (GAVA, 2009).

Antes do envase da água mineral, é necessário que os galões retornáveis passem por uma operação de sanitização que se dá por procedimentos físicos ou químicos que sejam de eficiência comprovada e aprovados pelo Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Na sanitização por meios físicos, os galões são submetidos a temperaturas elevadas pela exposição ao vapor ou imersão em água quente e também com a exposição à radiação ultravioleta (UV). No caso de uma sanitização através de agentes químicos, utiliza-se de

ácidos orgânicos ou umectantes. Por apresentarem valor mais acessível, geralmente são utilizados compostos clorados, iodados e quaternários de amônia (CARDOSO *et al.*, 2003).

Com relação à qualidade microbiológica, as águas minerais podem apresentar estirpes bacterianas inócuas antes do tratamento, do engarrafamento, do processamento ou mesmo proveniente do ambiente. Dentre os contaminantes microbiológicos preocupantes destacam-se espécies patogênicas como *Pseudomonas aeruginosa*, que são comumente encontradas em ambientes úmidos, sendo evidenciada no solo, na água e em humanos (ZAVASCKI, 2003).

Essa bactéria é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, não formador de esporos, capaz de produzir pigmentos fluorescentes e solúveis em água, como a piocianina e a pioverdina, o que contribui para sua fácil identificação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Além disso, a espécie é capaz de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos, sendo a mais comumente isolada em amostras de águas minerais naturais comercializadas em galões de 20 L no Brasil. *P. aeruginosa* é capaz de aderir e formar biofilmes em vários tipos de superfícies. Os biofilmes podem ser definidos como uma estrutura coletiva de células microbianas protegidas por uma matriz exopolissacarídica ou proteica que é sintetizada pelas células. Essas estruturas podem ocorrer em vários tipos de ambientes, sejam bióticos ou abióticos (PARSEK; TOLKER-NIELSEN, 2008).

O desenvolvimento dos biofilmes consiste em diversas etapas, que são regidas por diversos processos biológicos e físico-químicos (VADYVALOO; MARTÍNEZ, 2014). A massa celular formada pode agregar nutrientes que favorecem o crescimento microbiano e, também, outros tipos de microrganismos. A estrutura é formada a partir do depósito dos microrganismos sobre a superfície, que iniciam o processo de adesão reversível de células planctônicas, multiplicação e produção do Exopolissacarídeo (EPS) (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). Esta substância extracelular determina a estrutura funcional do biofilme e age como barreira defensiva, auxiliando na resistência às condições de estresse e conferindo proteção contra radiações UV, alteração de pH, choques osmóticos e dessecação.

Estudos revelam altas contagens de *P. aeruginosa* nos líquidos usados para enxaguar galões retornáveis, o que representa um risco de contaminação para água mineral (LEGNANI *et al.*, 1999). A resolução nº 275/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) referente ao regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural, define valores aceitáveis para a contagem de *P. aeruginosa*. A cada cinco amostras de 100 mL coletadas e analisadas individualmente, apenas uma pode apresentar o microrganismo, sendo o limite inferior de 1,0 UFC ou 1,1 NMP. Quanto mais baixo for esse

valor, maior a qualidade da água mineral. O máximo aceitável para a contagem do patógeno é de até 2,0 UFC ou 2,2 NMP, valores acima não são aceitos (BRASIL, 2005). No caso de valores variando entre 1,0 e 2,0 UFC tem-se a chamada qualidade marginal do produto. São satisfatórios resultados que indiquem a ausência do microrganismo.

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

2.1 Adesão bacteriana

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

Para a quantificação das células bacterianas aderidas, um cupom foi retirado, rinsado por 1 min em 10 mL de solução de NaCl a 0,85% para retirada de células planctônicas (não aderidas), transferidos para 10 mL de solução de NaCl a 0,85% e sonificados por 2 min em banho de Ultrassom a 40 kHz para desprendimento das células sésseis (aderidas). Diluições

decimais seriadas e sucessivas foram realizadas, seguidas de plaqueamento pela técnica de Microgotas em Ágar Cetrimide (Himedia®) e incubação a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. As células aderidas foram quantificadas e os resultados foram expressos em UFC/cm².

2.2 Potencial de biotransferência

Na avaliação do potencial de biotransferência das células aderidas aos cupons para a água mineral sem inoculação, um cupom foi retirado do sistema experimental e colocado em um novo sistema com 20 mL de água mineral esterilizada. Esse novo sistema foi mantido sob condições estáticas nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. A cada tempo avaliado, alíquotas de 100 µL foram retiradas e submetidas a diluições decimais seriadas sucessivas seguidas de plaqueamento por microgotas em Agar Cetrimide e incubação a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

2.3 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do hipoclorito de sódio foi realizada utilizando-se o método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos, por diluição para bactéria de crescimento aeróbio (NCCLS, 2005). Inoculou-se 12,5 µL da suspensão bacteriana com turbidez ajustada com a solução padrão de McFarland 0,5 em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de soluções de NaOCl em Caldo BHI (Himedia®) nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 mg/L. Após homogeneização em vórtex por 2 min, os tubos permaneceram a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Posteriormente, o crescimento microbiano foi avaliado por meio de adição de 125 µL de Cloreto de Tetrafeniltetrazólico (TTC), que indica a multiplicação celular, apresentando coloração avermelhada na presença de células viáveis (KLANCNIK *et al.*, 2010)

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

2.4 Sensibilidade ao sanitizante químico

Para testar a sensibilidade das células aderidas diante da solução sanitizante de hipoclorito de sódio (NaOCl), nove cupons foram submetidos à rinsagem com solução de NaCl a 0,85%. Em seguida, seis destes cupons foram transferidos para a solução sanitizante, composta por NaOCl, nas concentrações encontradas na CIM e na CBM em testes anteriores para a estirpe de *P. aeruginosa*. A solução testada como controle foi formulada com os

mesmos componentes da solução de NaOCl, no entanto, sem a presença deste. Os tempos de contato dos cupons com a solução de NaOCl e controle foram de 5, 7,5 e 10 min. Os tempos de contato dos cupons com a solução de NaOCl e controle (solução salina 0,85% esterilizada) foram de 5, 7,5 e 10 min. Em seguida, os cupons foram mantidos por um minuto em uma solução de Tiosulfato de Sódio a 0,25%, para neutralização do resíduo sanitizante. Para quantificação das células bacterianas após sanitização, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para a retirada de células aderidas e os resultados foram expressos em UFC/cm².

O experimento foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento. Para verificar o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio sobre as células aderidas, os valores UFC/cm² foram transformados em log (x+1) para atender a pressuposição da normalidade. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e os resultados foram analisados com o auxílio do SAEG (UFV, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células de *P. aeruginosa* apresentaram mecanismo de adesão na superfície de polipropileno, chegando a uma concentração média de 6,27 log UFC/cm² após cinco dias de contato. Esta concentração celular aderida ao polipropileno pode ser considerada muito elevada, visto que a água mineral estava com uma contaminação inicial de 2,0 log UFC/mL. Com o passar do tempo de experimentação, as células de *P. aeruginosa* tiveram capacidade de se multiplicar em água e aderir ao polipropileno em uma alta concentração, que pode ser considerada um biofilme bacteriano.

Os critérios para se considerar um biofilme uma população bacteriana aderida a uma superfície ainda é discutida. Segundo Ronner e Wong (1993) e Wirtanen, Husmark e Mattila-Sandholm (1996), são considerados biofilmes concentrações superiores a 5,0 e 3,0 log UFC/cm² respectivamente. Em contra partida, de acordo com Andrade, Bridgman e Zottola (1998), para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 7,0 log UFC/cm². Entretanto, o fato de ser considerado ou não um biofilme não reduz o problema de contaminação destas superfícies, pois em condições apropriadas de umidade, nutrientes, tempo e temperatura, células de *P. aeruginosa* podem continuar se multiplicando e produzindo substâncias poliméricas extracelulares para a formação do biofilme bacteriano. As células sésseis, presentes no biofilme, podem se desprender e contaminar outros ambientes, água e alimentos, promovendo prejuízos econômicos e riscos à saúde dos consumidores, além

de serem mais resistentes aos processos de sanitização (OLIVEIRA, BRUGNERA e PICCOLI, 2013).

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

Segundo Souza *et al.* (2019), a temperatura de armazenamento é um fator determinante na sobrevivência e multiplicação de *P. aeruginosa*. Este microrganismo possui a capacidade de se adaptar e permanecer viável na água com ausência de nutrientes, pela limitação do seu metabolismo, redução do tamanho celular, condensação do seu material genético e modificação da permeabilidade e estruturação da membrana plasmática (LEWENZA *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Souza *et al.* (2019) constatou que *P. aeruginosa* apresenta um maior aumento da população bacteriana em galões de 20 L, comparado às embalagens de 1,5 L, demonstrando que estes merecem atenção especial, uma vez que são retornáveis e que são armazenados em temperatura ambiente. Fatores como a oxigenação da água durante a estocagem, aumento da temperatura de armazenamento, resíduos de nutrientes provenientes das embalagens retornáveis e a formação de biofilmes também contribuem para a manutenção da sobrevivência e multiplicação destes microrganismos (VENIERI *et al.*, 2006).

Um ponto crítico da formação de biofilmes em superfícies vinculadas a alimentos é a capacidade que as células sésseis possuem de retornar à fase planctônica. Este mecanismo de despreendimento das células, também chamado de potencial de biotransferência, pode ocasionar uma nova contaminação, tornando o alimento impróprio para consumo. No presente estudo, a biotransferência de *P. aeruginosa* foi, em média, 5,57 log UFC/mL e não foi constatada diferença ($P > 0,05$) no número de células transferidas para a água quando se avaliaram os tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Esta concentração celular é extremamente elevada e preocupante, uma vez que a Resolução n° 275 da ANVISA (BRASIL, 2005), permite que águas minerais apresentem valores máximos de 0,3 log UFC/100 mL da espécie bacteriana avaliada em água mineral.

A CIM, ou seja, a concentração mínima que foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo foi de 200 mg/L, enquanto a CBM, que representa a concentração mínima do NaOCl que apresenta ação bactericida foi de 400 mg/L. Rutala *et al.* (1998) também testaram

soluções de NaClO frente a essa espécie bacteriana e observaram que a CIM e a CBM foi 100 mg/L. Esses autores verificaram que a cepa de *P. aeruginosa* apresentou susceptibilidade ao NaClO em concentração mais baixa do que as utilizadas no presente estudo.

Em relação à sensibilidade das células aderidas às soluções testadas, a solução controle não apresentou efeito inibitório ($P>0,05$) frente ao microrganismo testado. De acordo com a Tabela 1, após o contato dos cupons com a solução controle por 5; 7,5 e 10 min, foi possível constatar a presença de células aderidas em concentrações iguais ou superiores a 5,89 log UFC/cm² ($P>0,05$), o que já era esperado, uma vez que a solução salina 0,85% não apresenta ação bactericida ou bacteriostática.

As Células de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade às soluções de NaOCl, conforme pode ser observado pela redução do número de células aderidas ao polipropileno ao comparar a solução controle e as soluções sanitizantes (Tabela 1). Além disso, verificou-se que todos os tempos de contato testados foram suficientes para eliminar a quantidade de células aderidas nos cupons quando submetidas a procedimentos de sanitização com NaOCl a 200 e 400 mg/L, que foram as concentrações encontradas na CIM e na CBM respectivamente.

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

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

Fonte: Do autor, 2019.

Legenda: NaOCl: Hipoclorito de Sódio.

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

Na literatura, observa-se a escassez de trabalhos científicos que investiguem a aderência de *P. aeruginosa* em superfícies plásticas. Queiroz e Day (2007) investigaram a efetividade de NaOCl a 2500 mg/L frente a biofilmes de *P. aeruginosa* em superfícies de alumínio e aço inoxidável. Esses autores observaram que 5 min foi suficiente para reduzir em 4 Log e 5 Log o número de células aderidas em alumínio e aço inoxidável, respectivamente.

Como houve redução total no número de células sobreviventes após os tratamentos com ambas as concentrações de NaOCl, independente do tempo de exposição (Tabela 1),

pode-se sugerir um tratamento sanitizante eficiente baseado no uso de menor concentração do produto químico (200 mg/L) e um menor tempo de exposição (5 min). Desse modo, este protocolo de higienização poderia refletir em menor geração de resíduos de sanitizante e em menor tempo para uma sanitização eficiente.

4 CONCLUSÃO

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

5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J.; BRIDGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bactericide activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stain less steel as determined by plat count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.

ASSIRATI, D. M. Água Mineral. 2016. In: LIMA, T. M.; NEVES C. A. R. (cords.). **Sumário Mineral 2015**. Brasília, Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), v. 35, p. 22-23. ISSN: 01012053.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 173, de 13 de setembro de 2006**. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e de Água Natural. Brasília, DF, set. 2006. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/rdc0173_13_09_2006.html>. Acesso em: 09 ago. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 275, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MTk3Ng%2C%2C>>. Acesso em: 06 out. 2018.

CARDOSO, C. C.; VEIGA, S. M. O. M.; NASCIMENTO, L. C.; FIORINI, J. E.; AMARAL, L. A. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização de ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.1, n.23, p.59-61, 2003.

EIROA, M. N. U.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Variação da microbiota natural e de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral não carbonatada embalada em diferentes materiais durante o armazenamento a 30 C±1 C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 167-171, 1997.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GAVA, A. J. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2009.

KLANCNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERSEK, B.; MOZINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**. v. 81, p.121-126, 2010.

LEGNANI, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; TORINO, D; VALENTI, C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 53, p. 153-158, 1999.

LEWENZA, S.; ABBOUD, J.; POON, K.; KOBRYN, M.; HUMPLIK, I.; BELL, L. R.; MARDAN, L.; RECKSEIDLER-ZENTENO, S. *Pseudomonas aeruginosa* displays a dormancy phenotype during long-term survival in water. **Plos one**, v. 13, n. 9, p. e0198384, 2018.

NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição**. Norma NCCLS M7-A6. 53 p. 2005.

OLIVEIRA, E. D.; MARTINS, T. C. D; SANTOS, W. R.; SERRA, M. C.; PINHEIRO, E. M. Análise Mercadológica da Água Mineral Engarrafada Em São Luís-MA. **Qualitas Revista Eletrônica**, v. 19, n. 3, p. 38-52, 2020.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes em indústrias de laticínios: aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, n. 390, p. 65-73, 2013.

PARSEK, M. R.; TOLKER-NIELSEN, T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 560-6, 2008.

PEDROSA, A. P.; BRANDÃO, M. L. L.; MEDEIROS, V. M.; ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; ALMEIDA, A. E. C. C. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 2, 2014.

QUEIROZ, G. A.; DAY, D. F. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 4, p. 794-802, 2007.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; EL JAZIRI, M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 759348, p. 17, 2015.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

RUTALA, W. A.; COLE, E. C.; THOMANN, C. A.; WEBER, D. J. Stability and bactericidal activity of chlorine solutions. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 19, n. 5, p. 323-327, 1998.

SOUZA, A. P.; ROWLANDS, R. E. G.; MARTINS, C. G.; PAULA, A. P. R.; RISTORI, C. A. Sobrevivência e desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral experimentalmente contaminada. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, p. 1-8, 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

UFV – Universidade Federal de Viçosa. SAEG – **Sistema para análises estatísticas**. Versão 9.1. Ufv, Viçosa, Brasil, 2001.

VADYVALOO, V.; MARTÍNEZ, L. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 38, 2014.

VENIERI, D.; VANTARAKIS, A.; KOMNINO, G.; PAPANETROPOULOU, M. Microbiological evaluation of bottled non – carbonated (“still”) water from domestic brands in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 68 – 72, 2006.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

ZAVASCKI, A. P. **Fatores de risco para aquisição de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Imipenem em pacientes hospitalizados**. 2003. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003. Disponível em:<
<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/5438/000426274.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 20 jul. 2021.