

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA ISOLADOS DE DOCES TRADICIONAIS DE PELOTAS

YTACYANA MARIA NASCIMENTO PEREIRA¹; DARLA SILVEIRA VOLCAN
MAIA²; LOUISE HAUBERT³; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁴

¹Universidade Federal de pelotas – yta_pereira@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – darlavalcan@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – louisehaubert@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A comercialização de doces é uma das atividades econômicas mais importantes da cidade de Pelotas, RS. Esta tradição doceira foi incorporada pela colonização portuguesa, tornando a produção e consumo de doces parte da cultura local. No contexto atual, a cidade é considerada a capital nacional do doce (GUERREIRO; BRIDI, 2015).

Durante o preparo dos doces, micro-organismos patogênicos podem disseminar-se a partir de ingredientes contaminados, utensílios, superfícies ou por meio dos manipuladores (HOBBS; ROBERTS, 1999). Dentre estes micro-organismos, destaca-se o grupo dos estafilococos coagulase positiva (ECP) (BRASIL, 2014).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 49 espécies e 26 subespécies, que caracterizam-se por apresentarem morfologia de cocos Gram-positivos, formando arranjos semelhantes a cachos de uva. São micro-organismos anaeróbios facultativos, imóveis, mesófilos e que podem produzir enterotoxinas (BRASIL, 2013; EUZÉBY, 2015; TRABULSI et al., 2008). A maioria das espécies não apresenta capacidade de produzir a enzima coagulase, entretanto, *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* sintetizam essa enzima, sendo, portanto, denominados ECP (BANNERMAN, 2003).

A presença de ECP em alimentos processados, indica contaminação pelos manipuladores ou limpeza e desinfecção inadequadas de superfícies, utensílios e equipamentos (CARMO et al., 2005). Além disso, em determinadas condições ambientais e populacionais, esses micro-organismos podem produzir enterotoxinas no alimento, cuja ingestão pode causar a intoxicação estafilocócica (ECDC, 2015).

Outra característica importante desses micro-organismos é a capacidade de formar biofilme, a qual facilita sua adesão em superfícies abióticas e possibilita a sua multiplicação nesses locais, formando uma massa celular por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica (COSTERTON et al., 1999). A presença de biofilme em instalações industriais pode contaminar os alimentos, trazendo riscos à saúde dos consumidores (GUERRA et al., 2005).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme por estafilococos coagulase positiva, isolados de doces tradicionais de Pelotas.

2. METODOLOGIA

2.1 ISOLAMENTO

Foram analisadas 13 amostras de doces tradicionais de Pelotas, RS. A contagem de ECP foi realizada de acordo com a *American Public Health Association* (APHA, 2001). Inicialmente, pesou-se 25 g de amostra, adicionou-se

225 mL de Água Peptonada 0,1% em saqueta esterilizada, e homogeneizou-se em *stomacher*. Após, procedeu-se diluições seriadas até 10^{-3} e semeou-se uma alíquota de 0,1 mL em placas de Petri contendo ágar Baird Parker (ABP), incubando-se a 37°C por 48 horas. Em seguida, foram selecionadas 3 colônias características de cada placa, as quais foram inoculadas em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Os isolados foram selecionados pela capacidade de produção de coagulase livre em plasma de coelho, com incubação a 37°C e observação da formação de coágulo. Além disso, foram submetidos a testes adicionais, como a coloração de Gram e teste de catalase.

2.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada em superfície de aço inox, de acordo com o protocolo descrito por RIEU et al. (2007). Inicialmente, os isolados foram cultivados em ágar Triptona de Soja (TSA) e incubados à 37°C, por 24 horas. Sobre os cupons de aço inox foram adicionados 9 mL de caldo Triptona de Soja (TSB), acrescido de 1% de glicose, e o inóculo padronizado na escala 0,5 de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) e incubou-se à 25°C, por 24 horas. Após o período de incubação, foram realizadas 2 lavagens com solução Salina Fosfatada Tamponada (PBS) e, posteriormente, realizou-se esfregaço com 2 swabs esterilizados. Logo após, foram feitas diluições decimais seriadas e semeou-se em placas de Petri contendo TSA, incubando-se à 37°C por 24 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

WELKER et al. (2010) avaliaram alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, no período entre 2006 e 2007. Dos 186 surtos ocorridos, 28% foram ocasionados por ECP, o que demonstra a importância desses micro-organismos.

Duas das 13 amostras de doces analisadas (15%) apresentaram ECP, indicando práticas higiênico-sanitárias insatisfatórias durante a produção, armazenamento e/ou comercialização dos doces. Contudo, não ultrapassaram o limite de 10^3 UFC.g⁻¹ de alimento estabelecido pela RDC 12, estando aptas para o consumo (BRASIL, 2001). Resultados semelhantes foram descritos por GRANADA et al. (2003), que avaliaram o perfil higiênico sanitário de Quindins comercializados na cidade de Pelotas, RS, encontrando valores inferiores a 10^2 UFC.g⁻¹ nas amostras.

STEPANOVIC et al. (2007) consideram que um isolado é formador de biofilme quando alcança concentrações microbianas superiores a 3 log UFC.cm⁻². Dessa forma, de acordo com esses critérios, os dois isolados avaliados neste estudo são formadores de biofilme, pois atingiram concentrações microbianas superiores a 8 log UFC.cm⁻² (Tabela 1).

Tabela 1 – Formação de biofilme por estafilococos coagulase positiva isolados de doces tradicionais de Pelotas, RS

Isolado	Concentração bacteriana (log UFC. cm ⁻²)
E1	8,1
E2	8,5

MEIRA (2011) avaliou a capacidade de formação de biofilme em aço inox de *S. aureus* isolados de superfícies de processamento de carnes, e observou que 100% dos isolados eram formadores de biofilme, obtendo concentrações bacterianas entre 6 e 7 log UFC.cm⁻², valores inferiores aos encontrados neste estudo.

A formação de biofilme pode conferir aos micro-organismos resistência aos agentes antimicrobianos e sanitizantes empregados na indústria, o que pode torná-los persistentes no ambiente de processamento de alimentos, ocasionando riscos a saúde do consumidor (DONLAN; COSTERTON, 2002).

4. CONCLUSÕES

Estafilococos coagulase positiva provenientes de doces tradicionais de Pelotas, RS, apresentam capacidade de formar biofilme em superfície de aço inox. Esse resultado é relevante, haja vista que esses micro-organismos podem se aderir a superfícies e utensílios da indústria, bem como podem produzir enterotoxinas, ocasionando riscos a saúde do consumidor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of rd methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, DC, 2001.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA**. 2014. Acessado em: 19 de julho de 2016. Online. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds.). *Manual of clinical microbiology*. **American Society for Microbiology**, Washington, p.384-404, 2003.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC. Nº12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2001.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, Nova York, v.284, p.1318-1322, 1999.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v.15, n.2, p.167- 193, 2002.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, Stockholm, v.13, n.1, 162p., 2015.

EUZÉBY, J.P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. 2015. Acessado em: 10 de julho de 2016. Online. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>

GRANADA, G.G.; MENDONÇA, C.R.B.; PORTO, C.; ROSA, F.; SILVA, E.; SILVA, W.P.; KOETZ, P.R.; ZAMBLAZI, R.C. Perfil higiênico-sanitário de quindins comercializados em Pelotas/RS. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.14, n.1, p.57-61, 2003.

GUERRA, N.P.; ARAUJO, A.B.; BARRERA, A.M.; AGRASAR, A.T.; MACÍAS, C.L.; CARBALLO, J.; PASTRANA, L. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.68, p.1012-1019, 2005.

GUERREIRO, B.; BRIDI, G. Eventos gastronômicos como vetores para o desenvolvimento turístico. Um estudo de caso da FENADOCE Pelotas-RS. **Fólio-Revista Científica Digital-Jornalismo, Publicidade e Turismo**, Porto Alegre, v.1, n.1, 2015.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1999. 425p.

MEIRA, Q.G.S. **Capacidade de adesão, formação de biofilme e resistência a sanitizantes de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de serviços de alimentação**. 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba.

RIEU, A.; WEIDMANN, S.; GARMYN, D. agr System of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role Adherence and Differential Expression Pattern. **Applied and environmental microbiology**, Des moines, v.73, n.19, p.6125-6133 2007.

RODRIGUES, K.L.; MOREIRA, A.N.; ALMEIDA, A.T.S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M.J.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, Santa Maria v.34, n.1, p.297-299, 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation**, Oxford, v.115, n.8, p.891-899, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. 5 ed.

WELKER, C.A.D.; BOTH, J.M.C.; LONGARAY, S.M.; HAAS, S.; SOEIRO, M.L.T. ; Ramos, R.C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.8, n.1, p.44-48, 2010.