



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**INVESTIGAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE SANITIZANTES NA AVALIAÇÃO
DE SUPERFÍCIES POR ATP BIOLUMINESCÊNCIA**

Aline Oliveira e Silva

**Porto Alegre
2013/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**INVESTIGAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE SANITIZANTES NA AVALIAÇÃO
DE SUPERFÍCIES POR ATP BIOLUMINESCÊNCIA**

Aline Oliveira e Silva

Monografia apresentada ao Curso
de Engenharia de Alimentos, para
obtenção do Título de Engenheira
de Alimentos.

**Orientador: Eduardo Cesar Tondo
Co-orientadora: Letícia Sopena Casarin**

**Porto Alegre
2013/2**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
INVESTIGAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE SANITIZANTES NA AVALIAÇÃO
DE SUPERFÍCIES POR ATP BIOLUMINESCÊNCIA

Aline Oliveira e Silva

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

M. Sc. Eng. de Alim. Cheila Minéia Daniel de Paula

Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo, quero agradecer e dizer um super obrigada a minha família. Só de começar a escrever, já rolam as lágrimas pelo rosto. Pois vocês estiveram sempre comigo, me apoiaram em todas as escolhas e caminhos por mais loucos que parecessem. Acreditaram, acreditam e sempre acreditarão em mim, nos meus princípios e nos meus sonhos. Obrigada minha mãe, pai, mano, vó, tia, enfim, obrigada a todos vocês que sempre torcem por mim, que vibram com minhas conquistas e que me desejam sucesso e só o que há de melhor. Vocês são meu alicerce, minha vida. Se não fosse o suporte, o apoio, a compreensão, o colo, o carinho de cada um de vocês, eu não teria conseguido sozinha e jamais chegaria aonde cheguei. E sei que com vocês eu posso ir além. Obrigado por sempre estarem ao meu lado aconteça o que acontecer. Que mais sonhos se realizem pra gente comemorar junto.

Ao meu namorado, companheiro, amigo Artur. Que esteve ao meu lado nesse último ano de faculdade e talvez o mais difícil de todos. E que mesmo assim soube me compreender e me respeitar nos momentos de correria e dificuldade. Obrigada por sempre me encorajar. Por trazer alegria e saber dizer as palavras que eu precisava ouvir quando estava triste e estressada. Você chegou na hora certa, quando eu menos esperava e mais precisava.

Às melhores amigas que esses seis anos de faculdade poderiam me dar: Anelise, Gabriela, Juliana, Julise e Samantha. Obrigada pela amizade e por cada momento de risadas, de choros, de estudos, de festas, de viagens, de alegrias. Tudo isso valeu a pena porque vocês estavam do meu lado. O fim da faculdade representa só uma transição de fases em nossas vidas; que a amizade que aqui começou, torne-se ainda mais forte e que seja pra toda vida. Vocês são simplesmente demais.

A Deus, por ter me guiado durante a faculdade e em toda minha vida, fazendo com que eu seguisse meu caminho sem jamais desistir. Sei que estás guardando algo especial pra mim!

Ao meu orientador Eduardo Cesar Tondo, que despertou meu interesse pela Microbiologia e Controle de Qualidade de Alimentos, me fazendo acreditar que fiz a escolha certa ao optar pelo curso de Engenharia de Alimentos.

Obrigada pelo apoio, auxílio, parceria e liberdade para escrever essa monografia.

A minha co-orientadora Leticia Sopeña Casarín, que me forneceu a base prática para atuar no Lab 205, que se fez presente desde quando fui sua bolsista, em projetos paralelos, que me ajudou a conseguir meu primeiro estágio, que guiou meus passos durante essa primeira experiência. Obrigada por estar sempre presente, por ter me ajudado com esse TCC, e por sempre arranjar um tempinho pra mim apesar da correria. Te desejo muito sucesso e felicidade na carreira e na vida.

Ao Laboratório 205 do ICTA, que se tornou um lar de aprendizagem. Obrigada a todos que cruzaram meu caminho enquanto trabalhei nesse lab e que de uma forma ou outra me ajudaram a chegar até aqui.

À UFRGS, lugar em que passei grande parte dos últimos seis anos e ao ICTA e seus professores, que possibilitaram que eu expandisse meus conhecimentos, adquirisse aprendizados e fizeram com que eu queira ir além da faculdade.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo Geral	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	DESENVOLVIMENTO TEÓRICO	12
3.1	Método de ATP bioluminescência	12
3.1.1	<i>Adenosina trifosfato – ATP</i>	12
3.1.2	<i>Bioluminescência</i>	12
3.1.3	<i>Luciferina e luciferase</i>	13
3.1.4	<i>ATP bioluminescência</i>	14
3.1.5	<i>Luminômetro</i>	15
3.1.6	<i>Aplicações do método de ATP bioluminescência</i>	16
3.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	17
3.3	Higienização de Superfícies e Sanitizantes	19
4	INFLUENCE OF FOOD INDUSTRY SANITIZERS IN THE SURFACE EVALUATION BY ATP BIOLUMINESCENCE	21
4.1	Introduction	23
4.2	Material and methods	24
4.2.1	Sampling	24
4.2.2	Preparation of polyethylene plates	25
4.2.3	Inoculum preparation for contamination of polyethylene plates	25
4.2.4	Polyethylene plate surface contamination	25
4.2.5	Sanitizers' preparation	26
4.2.6	ATP bioluminescence analysis and Microbial enumeration	26
4.2.7	Statistical Analyses	27
4.3	Results and Discussion	27
4.4	References	31
5	CONCLUSÕES	35
6	REFERÊNCIAS	36

RESUMO

O método de ATP bioluminescência utilizado para monitoramento de higiene de superfícies depende da quantidade de matéria orgânica presente na superfície avaliada. Quanto maior a quantidade de matéria orgânica, maior será a quantificação de Unidades Relativas de Luz (URL). A lise celular bacteriana e subsequente liberação de matéria orgânica, resultante da utilização de sanitizantes sobre superfícies higienizadas, pode influenciar no número de URL medidas por um luminômetro. O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência de cinco sanitizantes comumente utilizados na higienização de superfícies em indústrias de alimentos sobre o número de URL gerados pelo método de ATP luminescência. Para isso, placas de corte de polietileno de 32x23cm foram divididas em 8 quadrados (5x5cm²) e artificialmente contaminadas com ~10⁴ UFC/mL de *Listeria monocytogenes*, utilizando uma esponja esterilizada para espalhar o inóculo. Quatro quadrados de cada placa foram amostrados com o 3M™ Quick Swab e os outros quatro quadrados foram amostrados com o swab de superfície 3M™ Clean Trace, visando enumeração microbiana e de URL, respectivamente. As amostras foram coletadas antes e após a utilização de hipoclorito de sódio (1 % e 2%), biguanida (0,6 % e 1,2 %), álcool etílico (70 % e 96%), quaternário de amônio (2% e 4%) e ácido peracético (1 % e 2 %). As contagens foram estatisticamente analisadas através dos testes de Wilcoxon e Mann-Whitney e do teste T de Student, utilizando o *software* Minitab®. Os resultados indicaram que ~10³ UFC/cm² de *L. monocytogenes* aderiram às placas de polietileno e depois da desinfecção não foram detectadas bactérias viáveis. A média dos valores de URL nas placas contaminadas variaram entre 437 e 47638 URL. Os valores de URL nas placas higienizadas foram reduzidos para contagens entre 36 e 127 URL para todos os sanitizantes e concentrações testadas. Comparando os valores de URL das placas higienizadas com as controles (sem tratamento e não contaminadas), os resultados demonstraram que a menor concentração de ácido peracético causou redução nas contagens de URL, enquanto todos os outros sanitizantes e concentrações elevaram as contagens de URL. Porém, nenhuma dessas interferências foi estatisticamente significativa.

Palavras-chave: ATP bioluminescência. Sanitizantes. *L. monocytogenes*.

Superfícies higienizadas.

ABSTRACT

The ATP bioluminescence system used for surface hygiene monitoring depends on the quantity of organic matter present on a surface. The greater the amount of organic matter, the higher the quantification of Relative Light Unit (RLU) will be. The cell lysis resulting after the usage of sanitizers may influence in the numbers of RLU measured by this detection system. The aim of this study was to evaluate the interference of five commonly used sanitizers for surface disinfection in food industries in the RLU counts generated by ATP *swab* detection system. So, polyethylene cutting boards (n=3) of 32x23 cm were divided in 8 squares (5x5cm²) and artificially contaminated with ~10⁴ CFU/ml of *Listeria monocytogenes*, using a sterile sponge to spread the inocule. Four squares of each board were swabbed with 3M™ Quick Swab and the other four squares were swabbed with 3M™ Clean Trace Surface swabs, aiming microbial and RLU enumeration respectively. Samples were taken before and after the use of sodium hypochlorite (1% and 2%), biguanide (0.6% and 1.2%), ethylic alcohol (70% and 96 °GL), quaternary ammonium (2% and 4%) and peracetic acid (1% and 2%). Counts were statistically analyzed using Wilcoxon and Mann-Whitney and T-test, using Minitab® software. Results indicated that ~10³ CFU/cm² of *L. monocytogenes* were adhered to polyethylene cutting boards and after sanitizing viable bacteria were not detected. The average of RLU values in the contaminated boards were from 437 to 47638 RLU. In the sanitized boards RLU counts were reduced to values ranging from 36 to 127 RLU to all sanitizers and concentrations tested. A comparison made between the RLU values of sanitized boards and control (untreated and uncontaminated) demonstrated that peracetic acid at the lowest concentration caused a quenching effect on RLU counts, while all other sanitizers and concentrations caused an enhancement effect on RLU values. However, none of these interferences were statistically significant.

Keywords: ATP bioluminescence. Sanitizers. *L. monocytogenes*. Sanitized surfaces.

1 INTRODUÇÃO

Garantir que as superfícies de contato com alimentos estejam livres de contaminação é um ponto crítico de controle comum em indústrias de alimentos. A matéria orgânica aderida às superfícies pode servir como uma fonte de nutrientes para os micro-organismos. Portanto, indústrias processadoras de alimentos necessitam de um programa de higienização eficaz para remover qualquer resíduo de alimentos e eliminar a contaminação microbiológica (SHAMA & MALIK, 2013; KUMARI & SARKAR, 2014).

Nos últimos anos, técnicas mais rápidas para o monitoramento de higienização de superfícies em indústrias alimentícias ganharam interesse e o método de ATP bioluminescência tornou-se uma escolha frequente para substituir métodos mais demorados e tradicionais (RATPHITAGSANTI et al., 2012). De fato, essa técnica gera resultados de forma mais ágil e eficaz, levando poucos segundos para realizar monitoramento de superfícies (MOROZ, GURSKII & UGAROVA, 2008).

O método de ATP bioluminescência é baseado na reação luciferina/luciferase, que emite luz, (STEVANI et al., 2013) e requer a presença de: enzima luciferase, substrato luciferina, oxigênio (O_2), cátion magnésio (Mg^{+2}) e ATP (adenosina trifosfato) (MARQUES & ESTEVES DA SILVA, 2009). O ATP é encontrado em células bacterianas e também em alimentos e em resíduos alimentícios (KIM et al., 2011), o que o torna um marcador da presença dos mesmos em superfícies analisadas. A quantidade de ATP presente na amostra analisada é proporcional à quantidade de luz emitida e o resultado é expresso em unidades relativas de luz (URL) (PARK et al., 2014).

A limitação desta técnica reside no fato de que quando células bacterianas são lisadas devido à ação de sanitizantes, o ATP intracelular pode influenciar na atividade enzimática da luciferase, interferindo nas contagens de URL.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi investigar a interferência de sanitizantes comumente utilizados em indústrias de alimentos na avaliação de superfícies por ATP bioluminescência.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a interferência do hipoclorito de sódio, quaternário de amônio, álcool etílico, ácido peracético e biguanida na avaliação de superfícies por ATP bioluminescência;
- Avaliar a eficácia dos cinco desinfetantes comumente utilizados na remoção de *L. monocytogenes* usando 3M™ Clean-Trace™ Superfície ATP System e contagem em petrifilm.

3 DESENVOLVIMENTO TEÓRICO

3.1 Método de ATP bioluminescência

3.1.1 Adenosina trifosfato – ATP

ATP é a sigla utilizada para se referir à adenosina trifosfato, um composto organofosfatado presente em todos os organismos biologicamente ativos, incluindo maior parte dos alimentos e resíduos alimentares (CALVERT, et al., 2000; KIM et al., 2011).

O ATP está presente em reações bioenergéticas de todas as células vivas, sendo um importante agente na maioria das reações enzimáticas bioquímicas, como síntese de proteínas, transporte ativo, movimentos e transmissão de impulsos nervosos, atuando como fonte primária de energia para o metabolismo celular (HEUNNEKENS & WHITELY, 1960; EDWIN, TIFFT & STUART, 1976; PACIELLO et al., 2013).

O ATP que é liberado por microrganismos destruídos (não viáveis) é rapidamente ativado por outros organismos ou pelo ambiente a sua volta e convertido em formas diferentes de fosfato. Portanto, a determinação de ATP pode ser considerada a medição dos organismos vivos de um sistema (LEVIN, CHEN & DAVIS, 1967).

3.1.2 Bioluminescência

De acordo com Peng (1976), diversos processos que produzem luz são genericamente relacionados ao termo “luminescência”. Nesse contexto, onde ocorre a conversão de energia em luz, Kricka e Thorpe (1983) afirmam que quimiluminescência é a luminescência que ocorre durante o acontecimento de uma reação química, e bioluminescência corresponde a reação de emissão de luz por sistemas biológicos. Toda bioluminescência é uma reação quimiluminescente (SHIMOMURA, 2006).

Diversos organismos vivos, como bactérias, fungos, insetos, crustáceos, moluscos, celenterados, peixes, algas primitivas e vermes terrestres e marítimos, apresentam algumas espécies com propriedades bioluminescentes

(STEVANI et al., 2013). Segundo Oliveira et al. (2013), tal fenômeno ocorre principalmente nos oceanos.

3.1.3 *Luciferina e luciferase*

O trabalho de Dubois (1885), no final do século 19, confirmou a ideia de bioluminescência animal. Sua experiência consistiu em fazer uma pasta a partir de material luminescente do besouro *Pyrophorus noctilucus*, que foi dividida em duas partes. Uma parte foi aquecida próxima ao ponto de ebulição, quando o brilho existente desapareceu, e a outra foi suspensa em água fria, obtendo uma solução brilhosa, que desapareceu ao longo do tempo. Após o resfriamento da solução quente, ambas as partes foram misturadas e foi observado que a emissão de luz recomeçou.

A conclusão de Dubois foi que a bioluminescência era química e que a parte termo-estável era provavelmente uma molécula orgânica, a qual ele nomeou “luciférine”. A outra parte, que precisou permanecer fria para uma reação efetiva, que em outras palavras era termo-lábil, foi chamada de “luciferase”, a qual ele acreditava ser uma enzima. Conseqüentemente, foi determinado que a geração de luz pela mistura das duas partes ocorreu através de uma reação substrato/enzima.

De acordo com estudos de McCapra (1976), as luciferases são classificadas como oxigenases e pertencem à família de proteínas formadoras de adenilato, devido às reações que catalisam. Já as luciferinas, que agem como substrato da reação, constituem um grupo de produtos naturais e estima-se que são sintetizadas durante todo o tempo de vida dos organismos.

Os termos criados por Dubois são utilizados até hoje, mas vale ressaltar que tanto luciferases quanto luciferinas provenientes de distintos organismos bioluminescentes diferem entre si (DESJARDIN; OLIVEIRA & STEVANI, 2008).

O isolamento, clonagem e purificação de luciferases têm sido desenvolvidos e utilizados no ramo da microbiologia para determinar a presença de ATP e detectar contaminação microbiológica (THORNE, INGLESE & AULD, 2010) e presença de matéria orgânica, por exemplo, sobre superfícies.

Atualmente, o gene da enzima luciferase obtido de vagalumes norteamericanos *Photinus pyralis*, e que catalisam a geração de luz em organismos bioluminescentes, são os mais estudados e utilizados (FRAGA, 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

3.1.4 ATP bioluminescência

Os trabalhos de McElroy (1947; 1951) nas décadas de 40 e 50, reproduzindo experimentos do século passado, mostraram que o ATP é um fator limitante e fundamental da bioluminescência. Desde então, pesquisas levaram a um melhor entendimento e compreensão de como a luz é produzida pelos vagalumes.

A descoberta da alta sensibilidade do ATP à luciferase e a simples detecção da atividade enzimática levaram ao desenvolvimento de um ensaio de ATP, um método eficiente e rápido para determinação de quantidade de ATP (LEVIN et al., 1964).

Essa técnica, hoje conhecida como método do ATP bioluminescência, é baseada na proporcionalidade entre luz emitida e concentração de ATP (KIMMICH, RANGLES & BRAND, 1975). O processo da reação para emissão de luz requer basicamente a presença da enzima luciferase, do substrato luciferina, oxigênio (O_2), cátion magnésio (Mg^{+2}) e ATP (SELIGER, 1989).

Na primeira etapa da reação, que ocorre na presença de ATP e Mg^{2+} , a luciferase converte D-luciferina em complexo luciferil adenilato, liberando pirofosfato livre (PPi). Esse complexo formado, ainda em catálise enzimática, sofre descarboxilação oxidativa na presença do oxigênio molecular, transformando-se em oxiluciferil-adenilato-enzima, eletronicamente excitado. Ao retornar ao estado mais estável, o complexo se dissocia, formando luciferase, monofosfato de adenosina (AMP), dióxido de carbono (CO_2), oxiluciferina e consequente emissão de fótons de luz. (SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F. & COSTA, 1993; WILSON & HASTING, 1998).

3.1.5 Luminômetro

Luminômetros são equipamentos capazes de medir a emissão de luz. Tubos fotomultiplicadores são os mais populares tipos de detector. Os elementos básicos desse instrumento são uma câmara de detecção à prova de luz e um detector de luz (KRICKA & THORPE, 1983).

Segundo Berthold e Tarkkanen (2013), a produção de bioluminescência através de reações de ATP e luciferase, conjuntamente com outros fatores, impulsionaram o desenvolvimento dos luminômetros. De acordo com os mesmos autores, o primeiro relato científico da palavra data do ano de 1968 (BURR & MAUZERALL, 1968).

Antes da descoberta e utilização de luminômetros, a bioluminescência era quantificada através de fluorímetros, contadores quânticos e contadores de cintilação líquida (ADDANKI, SOTOS & REARICK, 1966). Essa última é a adaptação mais sensível do contador quântico, descrita por Tal, Dicksteins e Sulman (1964) e que, mais tarde daria a base para a criação do luminômetro.

Nos anos 70, já havia comercialização de reagentes e fatores necessários para a medição de luz. Entretanto, métodos simples para o manuseio dos reagentes, transporte e preparação de amostras e medição de luz ainda eram escassos (BERTHOLD & TARKKANEN, 2013). Além disso, a obtenção de luciferase e luciferina, necessárias para a reação, era feita diretamente de insetos silvestres e devia ser congelada no momento da captura.

Da década de 80 em diante, diversos luminômetros foram desenvolvidos e introduzidos no mercado, tornando o processo mais simples, rápido e sensível. A medição de luz era realizada por instrumentos leitores de URL, método que permanece até os dias atuais. Vale ressaltar, que informações mais detalhadas a respeito de luminômetros industriais são dificilmente encontradas em literatura científica, visto que cada equipamento possui características próprias do fabricante.

Atualmente, a reação de luciferase/ATP ocorre instantaneamente, possibilitando a leitura de luz gerada, proporcional à quantidade de ATP na amostra, em poucos segundos (3M do Brasil, 2013).

Quanto aos agentes necessários para a reação, eles são obtidos através de síntese realizada em laboratório (GRIFFITHS, 1993).

3.1.6 Aplicações do método de ATP bioluminescência

Diversas tecnologias vêm sendo desenvolvidas, devido à crescente demanda por métodos rápidos de detecção. Dentre os métodos existentes, a ATP bioluminescência é considerada rápida e simples e tornou-se escolha para substituir métodos mais tradicionais (LARSON et al., 2003; RATPHITAGSANTI et al., 2012).

Métodos de bioluminescência têm sido largamente empregados em microbiologia, com o objetivo de detectar a contaminação microbiológica, e em biologia celular e molecular, para monitorar expressão gênica e interação proteína-proteína (RODA, 2004).

A técnica tem sido utilizada para monitorar ar, limpeza de superfícies e qualidade de produtos, principalmente em indústrias alimentícias, e em menor escala em indústrias farmacêuticas. Além disso, é cada vez mais utilizada em bioquímica, medicina, biotecnologia e monitoramento ambiental (GIROTTI et al., 1997; DOSTALEK & BRANYIK, 2005).

Desde a década de 90, o uso dessa técnica tem se tornado mais frequente na avaliação de higiene em indústrias de alimentos e de bebidas, principalmente no que diz respeito a equipamentos, materiais e superfícies (DOWHANICK & SOBCZAK, 1994).

A técnica de ATP bioluminescência é aconselhada por diversos estudos como indicadora de condições higiênicas pela presença de matéria orgânica em superfícies (ZOTTOLA, 1997). Tais pesquisas trazem informações importantes já que a matéria orgânica presente em superfícies pode facilitar o processo de aderência de bactérias e a formação de biofilmes (VERRAN & JONES, 2000). Contudo, cabe ressaltar que contagens de URL originárias do monitoramento de superfícies não necessariamente significam a presença de microrganismos sobre as mesmas, uma vez que o ATP responsável pelas URL pode ter sido proveniente de matéria orgânica não microbiana.

De fato, o ATP é encontrado em todos os organismos vivos e também em diferentes matérias orgânicas, como resíduos alimentares, podendo atuar

como indicador da presença dos mesmos (VENKATESWARAN et al., 2003). Isso é um benefício, já que a presença de matéria orgânica pode indicar ineficiência de procedimentos de higienização, enquanto a presença de microrganismos pode indicar um potencial impacto na saúde pública (KOO et al., 2013).

Os níveis de ATP presentes em células viáveis funcionam como um indicador na reação que ocorre com o complexo luciferina/luciferase, já que a quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de ATP (SUBRAMANI & DELUCA, 1988). A luz gerada é medida por um equipamento, o luminômetro, e o resultado é expresso em URL (CHEN & GODWIN, 2006).

Uma pesquisa realizada por Davidson et al. (1999), em meados da década de 90 com 500 indústrias alimentícias da Inglaterra, demonstrou que a técnica mais utilizada para monitorar limpeza de superfícies foi esfregação seguido por incubação em meio de cultura (48%), e que 27% dos entrevistados faziam uso do método de ATP bioluminescência.

Nos últimos anos, no entanto, a utilização deste método tem aumentado consideravelmente, embora não se tenha pesquisas mais recentes com os dados atuais sobre a sua utilização.

3.2 *Listeria monocytogenes*

Oito espécies do gênero *Listeria* são reconhecidas: *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii* e *Listeria rocourtiae* (GRAVES et al., 2010). Dessas, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas virulentas, sendo a última raramente associada à infecção humana (GUILLET, 2010).

Listeria monocytogenes é uma bactéria intracelular gram-positiva causadora da listeriose humana (KUSHWAHA & MURIANA, 2010). Representa, atualmente, um dos patógenos alimentares mais perigosos, com taxa de hospitalização de 94% e uma alta taxa mortalidade 15,9% (SCALLAN et al., 2011). Afeta mais frequentemente imuno-comprometidos, gestantes, bebês em gestação ou recém-nascidos, e idosos (NEWELL et al., 2010).

O micro-organismo é comumente encontrado no solo, águas superficiais, plantas e alimentos, mas também em alimentos prontos para o consumo, já que é capaz de crescer em temperaturas de refrigeração (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Essa bactéria é reconhecida por ser formadora de biofilmes que conseguem permanecer no ambiente por longos períodos em superfícies de contato com alimentos (RENIER, HEBRAUD, & DESVAUX, 2011), sendo capaz de aderir a superfícies onde há resíduos alimentares (POIMENIDOU et al., 2009).

Os biofilmes são uma associação de células bacterianas e material extracelular que formam uma matriz biológica ativa, aderida a uma superfície (WATNICK & KOLTER ITURRIAGA, 2000; TAMPLIN & ESCARTIN, 2007). A primeira etapa da formação de biofilmes é a adesão dos micro-organismos à superfície, que pode ocorrer em 3 a 5 segundos para algumas cepas de *L. monocytogenes* (TAKHISTOV & GEORGE, 2004). Essa estrutura facilita a persistência de micro-organismos no ambiente e oferece maior resistência contra tratamentos de desinfecção (VAN DER VEEN & ABEE, 2011).

Logo, a aderência desse patógeno a superfícies de contato de alimentos e a formação de biofilmes são um empecilho para a completa eficácia do processo de higienização (NORWOOD & GILMOR, 2001; BONSAGLIA et al., 2013) e tornaram-se um problema em diversos setores da indústria alimentícia (SREY, JAHID & HÁ, 2013). Segundo Gram et al. (2007), a *L. monocytogenes* aderida a superfícies é mais resistente a sanitizantes do que células planctônicas e essa resistência pode ser afetada pela matriz alimentar.

Em plantas de processamento, *L. monocytogenes* pode ser encontrada em pisos, ralos e equipamentos, sendo capaz de colonizar e de se multiplicar em superfícies como aço inoxidável, borracha, vidro, polipropileno e propileno (VAID, LINTON & MORGAN, 2010). Esse fato colabora para sua persistência em plantas processadoras de alimentos, aumentando a probabilidade de contaminação pós-processo (CHAE, 2006; GOH et al., 2013).

3.3 Higienização de Superfícies e Sanitizantes

Higienização é um processo dividido em duas etapas: limpeza e sanitização. A primeira parte refere-se à remoção mecânica da sujidade e dos microrganismos de uma determinada área (KUSUMANINGRU et al., 2003), enquanto sanitização corresponde à redução ou eliminação da contaminação microbiológica a um nível seguro (MARRIOTT & GRAVANI, 2006). Esse procedimento é fundamental em ambientes processadores de alimentos, pois uma higienização inadequada pode contribuir com contaminação cruzada, transmissão de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e aumento do risco de surtos alimentares (NYACHUBA, 2010).

Apesar de a limpeza ser capaz de remover até 90% de microrganismos, a sanitização é essencial para destruí-los e evitar sua aderência a outros lugares (FUGELSANG & EDWARDS, 2007). Os objetivos da higienização em plantas processadoras de alimentos são proteger o consumidor contra agentes patogênicos e garantir a qualidade dos alimentos (CHESWORTH, 1997), pois riscos microbiológicos nas superfícies de contato com alimentos podem ser evitados através do controle microbiológico dessas superfícies (BOLTON, 1998).

Uma boa escolha de materiais de limpeza e de agentes sanificantes são essenciais para garantir uma higienização eficaz. Diversos estudos citam o uso de sanitizantes como quaternário de amônio, hipoclorito de sódio, álcool, biguanida e ácido peracético para inativar patógenos alimentares como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (SOMERS & WONG, 2004; YANG et al., 2009).

Após o procedimento de higienização, deve haver uma avaliação a fim de mensurar a sua eficácia. Essa estratégia permite tomar ações corretivas caso a superfície avaliada tenha uma higienização insatisfatória (OGDEN, 1993).

Os métodos mais comuns para avaliação da eficácia desse procedimento são o esfregaço seguido por contagem em placas e o de ATP bioluminescência (DUARTE, et al., 2011). O último método tem sido vastamente empregado para essa finalidade, devido à sua rapidez, sensibilidade e simplicidade quando comparado ao primeiro. Entretanto, alguns

estudos relatam a influência de materiais de limpeza e sanitizantes no método do ATP- bioluminescência, o que pode gerar resultados falso-negativos ou falso-positivos, respectivamente (VELAZQUEZ & FEIRTAG, 1993; GREEN, RUSSELL & FLETCHER, 1999; LAPPALAINEN, et al., 2000).

4 INFLUENCE OF FOOD INDUSTRY SANITIZERS IN THE SURFACE EVALUATION BY ATP BIOLUMINESCENCE

Aline O. e Silva^{a*}, Letícia S. Casarín^a, Cheila Minéia Daniel de Paula^a, Cristina A. Constantino^b, Eduardo C. Tondo^a

^a Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b 3M Brazil

Keywords: ATP bioluminescence. Surface monitoring. Sanitizers. *L. monocytogenes*.

*Corresponding author. Telephone: +55 51 81401379.

Email address: aline_oliverr@hotmail.com.

ABSTRACT

The ATP bioluminescence system used for surface hygiene monitoring depends on the quantity of organic matter present on a surface. The use of sanitizers may cause bacterial cells lysis, resulting in intracellular ATP liberation, affecting Relative Light Unit (RLU) counts. The aim of this study was to evaluate the interference of five common food industry sanitizers in the RLU counts generated by ATP bioluminescence method. Polyethylene cutting boards were artificially contaminated with $\sim 10^4$ CFU/ml of *Listeria monocytogenes*, using a sterile sponge. One half of each plate was swabbed with 3M™ Quick Swab and the other half was swabbed with 3M™ Clean Trace Surface swabs, aiming to enumerate bacterial cells and RLU, respectively. Samples were taken before and after the use of sodium hypochlorite (SH) (1 % and 2 %), biguanide (BI) (0.6 % and 1.2 %), ethylic alcohol (EA) (70 % and 96 %), quaternary ammonium (QA) (2 % and 4 %) and peracetic acid (PA) (1 % and 2 %). Each sanitizer was tested using the recommended-manufacturer concentration (RMC) and a two-fold concentration. Counts were statistically analyzed using Wilcoxon and Mann-Whitney and T-test, using Minitab® program. Results indicated that $\sim 10^3$ CFU/cm² of *L. monocytogenes* were adhered to polyethylene cutting boards and after sanitizing viable bacteria were not detected. The average of RLU values in the contaminated boards were from 437 to 47638 RLU. In the sanitized boards RLU counts were reduced to values ranging from 36 to 127 RLU to all sanitizers and concentrations tested. A comparison made between the RLU values of sanitized boards and control (untreated and uncontaminated) demonstrated that PA at the lowest concentration caused a small quenching effect on RLU counts, while all other sanitizers and concentrations caused an enhancement effect on RLU values. However, none of these interferences were statistically significant. Therefore, the present study concluded that SH, BI, EA, QA and PA at two different concentrations did not significantly affect the RLU counts generated by ATP bioluminescence method.

4.1 Introduction

In 1885, Dubois has identified the phenomenon of animal bioluminescence and he created the French terms “luciférin” and “luciférase”, which were adapted to a variety of languages and remain until present. In fact, many animal species are able to produce bioluminescence, converting biochemical energy into light energy in biological systems (CHOLLET & RIBAUT, 2012). Currently, the North American firefly *Photinus pyralis* is the most extensively studied and used bioluminescent organism (VIEIRA, PINTO DA SIVA & ESTEVES DA SILVA, 2012).

McElroy (1947, 1951) was the first researcher who described the importance of adenosine triphosphate (ATP) for the bioluminescence, supporting that the light emission is proportional to the ATP quantity. These findings were the basis for the following researches responsible for the better comprehension of bioluminescence (SHIMOMURA, 2006) and for the ATP bioluminescence development.

The light emitted by ATP bioluminescence is measured by a luminometer and the results are expressed in RLU (CHEN & GODWIN, 2006). This method is based on luciferin/luciferase reaction (WILSON & HASTINGS, 1998; STEVANI et al., 2013), requiring the presence of luciferase enzyme, luciferin substrate, oxygen (O^2), magnesium cation (Mg^{+2}) and ATP (MARQUES & ESTEVES DA SILVA, 2009). Indeed, ATP is found not only in bacterial cells, but also in most food and food residues (CALVERT et al., 2000; KIM et al., 2011), because it is necessary for all bioenergetic reactions of living cells (BERTHOLD & TARKKANEN, 2013). Consequently, the ATP may be originated from food residues or microbial cells, both indicating the inefficiency of hygiene procedures in food industries. While food residues may promote microbial multiplication, microorganisms themselves can possibly represent a potential impact on public health (KOO et al., 2013).

Several technologies have been developed in the last decades in order to satisfy the increasing demand for rapid detection methods in food industries. ATP bioluminescence system is fast and simple and has become a current choice to replace traditional techniques of surface monitoring (LARSON, 2003; RATPHITAGSANTI et al., 2012). In fact, ATP bioluminescence methods have been used in many areas and applications, such as biochemistry, medicine, biotechnology, bioimaging and environmental monitoring (MOROZ & GURSKII, 2008; RODA, 2012).

In food industries, ATP bioluminescence is indicated for a quick inventory of the cleanliness of equipments (WIRTANEN & SALO, 2005; NARSAIAH et al., 2012) and this method has been used in combination with HACCP system, becoming well known in the food processing plants (SHAMA & MALIK, 2013). Nevertheless, some studies have reported the influence of sanitizing agents in the ATP bioluminescence method, which can generate false-positive or false-negative results.

Several authors have reported the interference of sanitizers on ATP bioluminescence signal (VELAZQUEZ & FEIRTAG, 1997; GREEN, RUSSELL & FLETCHER, 1998; GREEN, RUSSELL & FLETCHER, 1999; TURNER et al., 2010). However, as far as we are concerned, researches of sanitizers' influence on this luminescent technique have not been explored lately, as well as the effect of biguanide, ethylic alcohol and peracetic acid, which is not well documented. Furthermore, it has not been explored the ATP bioluminescence evaluation in sanitizers' efficacy against *L. monocytogenes* in polyethylene surfaces.

The aim of this study was to investigate the interference of five commonly used sanitizers (SH, BI, EA, QA and PA) in the RLU counts generated by ATP bioluminescence system. Additionally, the efficacy of sanitizers against *L. monocytogenes* contaminating polyethylene cutting boards was also evaluated, since they have the ability to adhere to surfaces and form biofilms, being able to contaminate finished products (BAE, BAEK & LEE, 2012; SCHÖBITZ et al., 2014).

4.2 Material and methods

4.2.1 Sampling

In order to achieve a reasonable sampling to obtain accurate results and to make this work possible to be statistically analyzed, each experiment was done in triplicate. For that, three polyethylene cutting boards were designed for each sanitizer at a different concentration, totaling thirty boards (5 sanitizers x 2 different concentrations x 3 boards).

From each cutting board, four labeled samples were taken in order to be evaluated by ATP bioluminescence analysis and other four different samples were designed for microbial enumeration. This sampling was done in the control boards, in

the contaminated ones and after they were disinfected. So, for each sanitizer at a defined concentration, twelve samples were designed for each method (1 sanitizer x 1 concentration x 4 samples x 3 boards).

4.2.2 *Preparation of polyethylene plates*

Using a knife, the thirty new polyethylene cutting plates were divided into 8 squares of 5 x 5 cm. Before experiments, all cutting plates were washed with potable water and neutral detergent, rinsed with sterile distilled water and dried with disposable sterile white paper. After that, the plates were sterilized in autoclave, under 121° C for 15 minutes, inside sterile plastic bags and stored until experiments.

4.2.3 *Inoculum preparation for contamination of polyethylene plates*

Listeria monocytogenes (strain J11), isolated from a bovine exporter slaughterhouse located in Southern Brazil, was inoculated in 10 ml of TSB (Tryptic Soy Broth, MERCK) supplemented with 0.6 % yeast extract and incubated at 37° C for 18 h. Then, 1 ml of culture was successively diluted in tubes containing 9 ml of 0.1 % sterile peptone water, achieving $\sim 10^4$ CFU/ml. Bovine serum albumin was added until a final concentration of 5 % in order to simulate the presence of organic matter.

4.2.4 *Polyethylene plate surface contamination*

A quantity of 5 mL of *L. monocytogenes* dilution containing $\sim 10^4$ CFU/ml were dispensed onto the surface of the thirty plates (area of 32 cm x 23 cm). Using a sterile sponge, the inoculum was spread over the surface of polyethylene plates, during 1 minute in three different directions. The plates were dried for 20 minutes at ambient temperature of approximately 25° C and the 4 squares labeled on the surfaces were sampled using 3M™ Clean-Trace™ Surface ATP swabs, for enumeration of RLU, while other 4 squares were sampled with 3M™ Quick Swab, for enumeration of *L. monocytogenes*. Control polyethylene plates (uncontaminated

and untreated with sanitizers) were also divided in 8 squares and were sampled as the same way as the contaminated plates.

4.2.5 Sanitizers' preparation

Five sanitizers commonly used in food industries were prepared immediately before use. Each three contaminated plates were disinfected with a different sanitizer and two concentrations of this sanitizer (Table 1). Plates were immersed in 1 liter of pre-prepared solution of each sanitizer, except for EA, which disinfection occurred by spraying the solution on the plates. The period that each sanitizer remained in contact with surfaces were those recommended by manufacturer, meaning all sanitizers had an action time of fifteen minutes. Then, 4 randomly chosen squares were sampled with 3M™ Clean-Trace™ Surface ATP swabs and 4 squares were sampled with 3M™ Quick Swab.

Table 1 – The five sanitizers at two different concentrations used for disinfect the contaminated cutting boards.

Sanitizer	Brand	Abbreviation	C1	C2
Sodium hypochlorite	Kalykim Brazil	SH	1 %	2 %
Biguanide	Kalykim Brazil	BI	0,6 %	1,2 %
Quaternary ammonium	Kalykim Brazil	QA	2 %	4 %
Peracetic acid	Kalykim Brazil	PA	1 %	2 %
Ethyl alcohol	Kalykim Brazil	EA	70 %	96 %

C1: concentration recommended by manufacturers; C2: two-fold of the concentration recommended by manufacturer, except for ethyl alcohol.

4.2.6 ATP bioluminescence analysis and Microbial enumeration

3M™ Clean-Trace™ Surface ATP swabs were analyzed using the 3M™ Clean-Trace™ NG Luminometer, while 3M™ Quick Swabs were returned to a tube containing letheen neutralizing buffer and vigorously shaken to release bacteria from the swab tip. The contents (1 ml) of the tubes containing samples collected from untreated and uncontaminated (control) polyethylene plates were poured onto a 3M™ Petrifilm™ plate for mesophilic microorganisms, while the contaminated and

sanitized surface samples were poured onto 3M™ Petrifilm™ Environmental *Listeria* Plates. The Petrifilm plates were incubated at 37°C for 24 h so as to enumerate the microorganisms.

4.2.7 Statistical Analyses

The results of each sanitizer and each concentration were organized in graphics and graphical analyses and hypothesis testing were carried out. Statistical analysis to compare infected and disinfected plates was made by Wilcoxon. Data distribution were analyzed by Dotplot and Boxplot charts. It was also evaluated the difference between the concentrations for each sanitizer, using T-test (to compare the difference between normal data distribution) Mann-Whitney (non-parametric method to compare medians of non-normal distributions).

4.3 Results and Discussion

It is well known that several strains of *L. monocytogenes* can adhere to abiotic surfaces present in food processing facilities (CHAE AND SCHRAFT, 2000; SINDE & CARBALLO, 2000). In our study, 5 ml of *L. monocytogenes* culture presenting $\sim 10^4$ CFU/ml were inoculated onto surfaces of polyethylene plates, resulting in $\sim 10^3$ CFU/cm² of *L. monocytogenes*, after 20 minutes. As shown in Figure 1, RLU counts of contaminated plates demonstrated values that ranged from 437 to 47638 RLU, while control plates demonstrated RLU counts ranging from 28 to 59 and no microorganisms on that.

After contamination with *L. monocytogenes*, the polyethylene plates were disinfected using SH, BI, EA, QA and PA at two different concentrations (TABLE 1). Evaluation of sanitizers' efficiency was measured by ATP bioluminescence method, expressed in RLU, and by swabbing followed by petrifilm incubation, aiming microbial enumeration expressed in CFU/cm². According to 3M™ Company, the Pass/Fail threshold value recommendation is that RLU counts under or equal 250 are acceptable.

Relative light unit counts after sanitization resulted in values ranging from 36 to 127 RLU (Figure 1) to all sanitizers, and the microbiological counts were zero,

regardless sanitizer or concentration, meaning that all treatments were effective to remove the contamination. These results are in agreement with the ones found by Cruz and Fletcher (2012), where SH, BI, QA and PA achieved a 5-log₁₀ reduction of viable cells of suspended *L. monocytogenes*.

Meanwhile, Bae, Baek and Lee (2012) have demonstrated that EA was effective against attached pathogens and biofilms on the surface of stainless steel, indicating its use on the surfaces of utensils, cooking equipment, and other related materials to destroy or reduce microbial contamination.

Comparing results from control and disinfected plates, our findings demonstrated a small decreasing effect on RLU counts caused by peracetic acid at the lowest concentration, while a slight increase of the RLU signal was detected for all other sanitizers and concentrations (Figure 2). Nevertheless, statistical analysis was not able to confirm significant differences between control and disinfected plates counts, regardless the sanitizer or concentration.

Velazquez and Feirtag (1997) investigated the effect of extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. In their experiments, *L. monocytogenes* represented one of the ATP sources. QA (six concentrations from 25 to 800 ppm) and SH (six concentrations between 0.01 and 5 %) were surveyed. This study has deduced that the lowest QA concentration and above 300 ppm concentration significantly enhanced effect on RLU counts. SH effect was concentration-dependent. There was a significant increase on RLU measurement for the lowest concentration, than an insignificant influence, followed by a decreasing effect as the SH concentration increased (above 0.1 %).

Green, Russel and Fletcher (1998) have also studied the effect of chemical cleaning agents, including SH (30, 50, 70 ppm) and QA (10, 20, 30 ppm), on ATP bioluminescence measurements. This study has evaluated the interference of three sources of ATP: *Escherichia coli*, chicken blood and pure ATP. They found that QA had a slight increasing effect on RLU counts, however neither QA nor SH at the established concentrations had a statistically interference on the measurements, regardless the ATP source. These results are in agreement with our results, since we have not found significant interference of sanitizers on the RLU counts as well.

The same authors (GREEN, RUSSEL & FLETCHER, 1999) have done other study investigating chlorinated sanitizers and QA. This research has used as ATP

source a pure ATP solution (PATP) and chicken exudates (CEATP). Their results showed that chlorinated agents decreased RLU in a dose-dependent manner for PATP. There was a slightly decrease on RLU counts at the two lower concentrations for the CEATP, and the higher concentration did not affect measures. Meanwhile, RLU counts were affected by QA, significantly increasing measures at all concentrations for CEATP and for the two higher concentrations for PATP. In opposite, our research has only identified quenching effect on RLU counts for peracetic acid at the lowest concentration (1 %), but it was not statistically significant. These authors have reported significant enhancement interference of QA on measurement by ATP bioluminescence. Our study has demonstrated a slight increasing effect by QA, but it was not statistically significant.

Turner et al. (2010) have demonstrated that all of RLU counts for disinfectant-solutions were lower than control ATP preparations. Their findings included the effect caused by QA product, 10 % bleach and hydrogen peroxide–peracetic acid mixture. However, none of these results were statistically significant.

Table 2. Mean values of RLU for control, contaminated with *L. monocytogenes* and disinfected polyethylene cutting boards submitted to different sanitizers at two concentrations (C1 and C2).

		Average counts (RLU)					
Sanitizer	Abbreviation	Control		Contaminated Plates		Disinfected plates	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2
Sodium hypochlorite	SH	39	43	47638	4980	45	70
Biguanide	BI	45	28	2791	3877	98	108
Ethylic alcohol	EA	30	28	441	437	127	94
Quaternary ammonium	QA	33	31	3393	1701	48	53
Peracetic acid	PA	59	33	3391	3018	39	36

C1: concentration recommended by manufacturers (SH: 1%; BI: 0,6%; EA: 70%; QA: 2%; PA: 1%); C2: two-fold of the concentration recommended by manufacturer (SH: 2%; BI: 1,2%; EA: 96%; QA: 4%; PA: 2%).

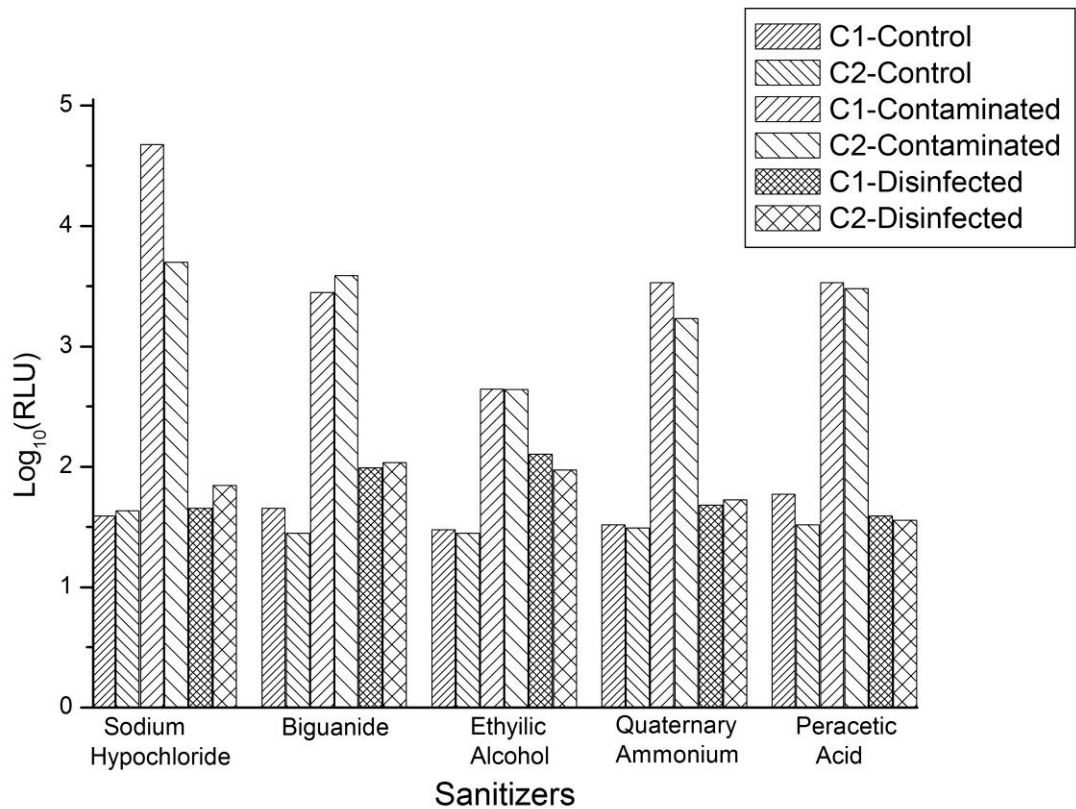


Figure 1. Effect of five different sanitizers on the RLU counts generated by ATP bioluminescence method. Sodium hypochlorite (SH): C1= cutting board plates disinfected with 1% SH and C2 = cutting board plates disinfected with 2% SH; Biguanide (BI): C1= cutting board plates disinfected with 0,6% BI and C2 = cutting board plates disinfected with 1,2% BI; Ethylic alcohol (EA): C1= cutting board plates disinfected with 70% EA and C2 = cutting board plates disinfected with 96% EA; Quaternary ammonium (QA): C1= cutting board plates disinfected with 2% QA and C2 = cutting board plates disinfected with 4% QA; Peracetic acid (PA): C1= cutting board plates disinfected with 1% PA and C2 = cutting board plates disinfected with 2% PA.

The present study demonstrated that that peracetic acid at the lowest concentration (1%) caused a quenching effect on RLU counts, while all other sanitizers and concentrations caused an enhancement effect on RLU values. However, none of these interferences were statistically significant, what means SH, BI, EA, QA and PA at two different concentrations did not significantly affect the RLU

counts generated by ATP bioluminescence method. Besides, all sanitizers and concentrations were efficient in combating *L. monocytogenes*.

It is important to note that these distinct results obtained from this study and other researches may be due to many factors. There is a variety of luminometers available on the market and each equipment present their own properties and instructions. Another point is the operator, who must be trained in order to obtain accurate results, otherwise it may compromise results. Besides, this discussion compared results from different studies, but none of them were taken on the same conditions, what may explain such

The current data indicates ATP bioluminescence method for monitoring surface hygiene procedures in food industries, stressing the importance of following manufacturer's instructions related to equipments and sanitizers. However, the present study suggests the integrated usage of ATP bioluminescence method and microbiological techniques, so as to obtain results as trustworthy as possible. Besides, further studies are needed on this field, since there are a few recent publications and because the influence of ethylic alcohol, peracetic acid and biguanide have not been well explored.

4.4 References

3M Solutions. **Hygiene Management Guide for Environmental Surfaces**. Infection Prevention Division 3M Health Care. 2013

BAE, Y.M.; BAEK, S.Y; LEE, S.Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 465-473, Feb. 2012.

BERTHOLD, F.; TARKKANEN, V. Luminometer development in the last four decades: recollections of two entrepreneurs, **Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence**, New York, v. 28, n. 1, p 1–6, Feb. 2013.

CALVERT, R.M. et al.. Caged ATP - an internal calibration method for ATP bioluminescence assays. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 30, n. 3, p. 223-227, Mar. 2000.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 103–111, Dec. 2000.

CHEN, F. C., & GODWIN, S. L. Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n.10, p. 2534-2538, Oct. 2006.

CHOLLET, R.; RIBAUT, S. Use of ATP Bioluminescence for Rapid Detection and Enumeration of Contaminants: The Milliflex Rapid Microbiology Detection and Enumeration System. In: LAPOTA, D. **Bioluminescence - Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications**. Rijeka: InTech, 2012, p. 99-118.

CRUZ, C.D.; FLETCHER, G.C. Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 26, n.1, p. 194 -199, Jul. 2012.

DUBOIS, R. Note sur la physiologie des pyrophores. **Comptes rendus de la Société biologique**, v. 8, n. 2, p. 559–562, 1885.

GREEN, T.A.; RUSSELL, S.M.; FLETCHER, D.L. Effect of chemical sanitizing agents on ATP bioluminescence measurements. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 8, p. 1013 – 1017, Aug. 1998.

GREEN, T.A.; RUSSELL, S.M.; FLETCHER, D.L. Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 1, p. 86 – 90, Jan. 1999.

KIM, S. Y. et al.. Comparison of molecular and total ATP-based analytical methods with culture for the analysis of bioaerosols. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 9, p. 1732 – 1737, Apr. 2011.

KOO, O.K., et al.. Comparison of cleaning fabrics for bacterial removal from food-contact surfaces. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 292-297, Mar. 2013.

LARSON, E.L. et al.. 2003. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 6, p. 6735– 6739, Dec. 2003.

McElroy, W. D. The energy source for bioluminescence in an isolated system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington D.C., v.33, n. 1, p. 342–345, 1947.

McElroy, W. D. Properties of the reaction utilizing adenosinetriphosphate for bioluminescence, **Journal of Biological Chemistry**, Maryland , v. 191, n.2, p. 547–557, Aug. 1951.

MOROZ, N.A.; GURSKII, D.YA.; UGAROVA, N.N. Stabilization of ATP Reagents Containing Firefly *L. mingrelica* Luciferase by Polyols. **Moscow University Chemistry Bulletin**, Moscow, v 63, n 2, p. 67-70, Apr. 2008.

NARSAIAH, K. et al.. Estimation of total bacteria on mango surface by using ATP bioluminescence. **Scientia Horticulturae** , v. 146, n. 1, p. 159–163, Oct. 2012.

RATPHITAGSANTI, W. et al.. High-throughput detection of spore contamination in food packages and food powders using tiered approach of ATP bioluminescence and real-time PCR. **LWT – Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 341–348, Apr. 2012.

RODA, M. G. Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. **Analytical and Bioanalytical. Chemistry**, v. 402 n. 1, p. 69–76, Jan. 2012.

SCHÖBITZ, R. A biocontroller to eliminate *Listeria monocytogenes* from the food processing environment. **Food Control**, Guildford, v. 36, n. 1, p. 217-223., Feb. 2014.

SHAMA, G.; MALIK, D.J. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 3. p. 115 – 125, Mar. 2013.

SHIMOMURA, O. **Bioluminescence: Chemical Principles and Methods**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2006, p. 17 – 27.

SINDE, E.; CARBALLO, J., 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber, and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 4, p. 439–447, Aug. 2000.

STEVANI, C.V. et al.. Current status of research on fungal bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 6, p. 1318 – 1326, Aug. 2013.

TURNER, D.E. et al.. Efficacy and Limitations of an ATP-Based Monitoring System. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 2, p. 190 – 195, Mar. 2010.

VELAZQUEZ, M.; FEIRTAG, J.M. Quenching and Enhancement Effects of ATP extractants, cleansers and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 7, p. 799-803, Jul. 1997.

VIEIRA, J.; PINTO DA SILVA, L.; ESTEVES DA SILVA, J.C.G. Short review- Advances in the knowledge of light emission by firefly luciferin and oxyluciferin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, n.1, p. 33–39, Dec. 2012.

WILSON, T.; HASTINGS, J.W. Bioluminescence. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, California, v. 14, n.1, p. 197-230, Dec. 1998.

WIRTANEN, G.; SALO, S. Biofilm risks. In: LELIEVELD, H. L. M.; MOSTERT, M. A.; HOLAH, J. **Handbook of hygiene control in the food industry**. Woodhead Publishing Limited: Abington, 2005. p 46 – 68.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que hipoclorito de sódio (1 % e 2%), biguanida (0,6 % e 1,2 %), álcool etílico (70 % e 96° GL), quaternário de amônio (2% e 4%) e ácido peracético (1 % e 2 %) não interferiram significativamente nas contagens de URL geradas pelo método de ATP bioluminescência, quando a avaliação das placas de corte de polietileno controle e desinfetadas foram comparadas.

Foi observado que a menor concentração de ácido peracético causou diminuição nas contagens de URL, enquanto todos os outros sanitizantes e concentrações causaram aumento nesses valores. Contudo, nenhuma dessas influências foi estatisticamente significativa. Além disso, todos os sanitizantes e concentrações aplicadas foram eficazes na remoção de *L. monocytogenes* das superfícies avaliadas.

Davidson et al. (1999) compararam a técnica de ATP bioluminescência com o teste tradicional microbiológico e mostraram que o primeiro obteve melhor reprodutibilidade, indicando esse sistema como método inicial de escolha em monitoramento de higiene, especialmente como parte do plano HACCP. Os mesmos autores sugeriram que a ocorrência de problemas relacionados com esse teste rápido é mais provavelmente devido ao modo de execução dos ensaios e da sanitização do que devido ao próprio sistema de detecção. Esta afirmação aplica-se ao presente estudo, uma vez que os resultados obtidos diferem de diversas outras pesquisas científicas, especialmente em relação ao efeito dos sanitizantes sobre as contagens de URL gerados. Isto pode ser devido às condições em que cada estudo foi conduzido.

Desse modo, o presente estudo indica o método de ATP bioluminescência para avaliação e monitoramento de higiene de superfícies. Entretanto, ressalta-se a importância da realização de procedimentos de higiene adequados, seguindo as instruções dos fabricantes dos produtos utilizados. Indica-se também a utilização integrada desse método em conjunto com testes microbiológicos, a fim de adquirir resultados mais confiáveis e coerentes o possível.

6 REFERÊNCIAS

3M do Brasil Ltda. 3M Clean-Trace™ Luminômetro UNI-Lite NG. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/MedicoHospitalar/Home/ProdutSolucoes/CentralMatEsterilizacao/Limpeza/CleanTraceLimpeza/CleanTraceTMLuminometroUNILiteNG/> Acesso em: 25 outubro 2013.

ADDANKI, S.; SOTOS, J.F.; REARICK, P.D. Rapid determination of picomole quantities of ATP with a liquid scintillation counter. **Analytical Biochemistry**, v. 14, n. 2, p. 261-264, fevereiro 1966.

BERTHOLD, F.; TARKKANEN, V. Luminometer development in the last four decades: recollections of two entrepreneurs. **Luminescence**, New York, v. 28, n. 1, p 1–6, janeiro - fevereiro 2013.

BOLTON, F. J. Quality assurance in food microbiology - a novel approach. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v. 45, n.1, p. 7-11, novembro 1998.

BONSAGLIA, E.C.R., et al.. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 35, n. 1, p. 386 – 391, janeiro 2014.

BURR, A.; MAUZERALL, D. The oxygen luminometer. An apparatus to determine small amounts of oxygen, and application to photosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 153, n.3, p. 614 – 624, abril 1968.

CALVERT, R.M. et al.. Caged ATP - an internal calibration method for ATP bioluminescence assays. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 30, n. 3, p. 223-227, março 2000.

CHAE, M.S., et al.. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 3, p. 250-259, maio 2006.

CHEN, F. C., & GODWIN, S. L. Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n.10, p. 2534-2538, outubro 2006.

CHESWORTH, N. **Food Hygiene Auditing**. New York: Chapman & Hall, 1997.

DAVIDSON, C.A. et al. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness - ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. **Luminescence**, New York, v. 14, n. 1, p. 33–38, janeiro - fevereiro 1999.

DESJARDIN, D.E.; OLIVEIRA, A.G; STEVANI, C.V. Fungi bioluminescence revisited. **Photochemical & Photobiological Sciences**, London, v.7, n.2, p. 170-182, fevereiro 2008.

DOSTALEK, P.; BRANYIK, T. Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry - a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 23, n.3, p. 85-92, 2005.

DOWHANICK, T.M.; SOBCZAK, J. ATP bioluminescence procedure for viability testing of potential beer spoilage microorganisms. **Journal of the American Society of Brewing Chemists** , v. 52, n. 1, p. 19-23, 1994.

DUARTE, F. L. et al. Commercial sanitizers efficacy – a winery trial. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Dois Portos, v. 26, n. 1, p. 45-52, 2011.

DUBOIS, R. Note sur la physiologie des pyrophores. **Comptes rendus de la Société biologique**, v. 8, n. 2, p. 559–562, 1885.

EDWIN, C. ;TIFFT, JR.; STUART J. S. Use of Adenosine Triphosphate Assay in Disinfection Control. **Environmental Science & Technology**, New York, v. 10, n. 13, dezembro 1976.

FRAGA, H. Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments, **Photochemical & Photobiological Sciences**, London, v.7, n.2, p. 146–158, fevereiro 2008.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 182.

FUGELSANG K.C.; EDWARDS C.G. **Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures**. Nova York: Springer, 2006, p. 139-151.

GIROTTI, S. et al. Determination of microbial contamination in milk by ATP assay. **Czech Journal of Food Science**, v. 15, n. 4, p. 241-248, agosto 1997.

GOH, S.G., et al.. Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken meat to cooked chicken meat through cutting boards. **Food Control**, Guildford, v. 37, n. 1, p. 51 - 55, março 2014.

GRAM, L. et al. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v.18, n.10, p. 1165-1171, outubro 2007.

GRAVES, L.M. et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1280-1288, junho 2010.

GREEN, T.A.; RUSSELL, S.M.; FLETCHER, D.L. Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 1, p. 86–90, janeiro 1999.

GRIFFITHS, M. W. Applications of bioluminescence in the dairy industry, **Journal of Dairy Science**, Illinois, v. 76, n. 10, p. 3118-3125, outubro 1993.

GUILLET, C. et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 136-138, janeiro 2010.

HEUNNEKENS, F. M., WHITELEY, H. R. In: FLORKIN, M., MASON, H.S. **Comparative Biochemistry**, New York: Academic Press, 1960, p. 107.

ITURRIAGA, M.H.; TAMPLIN, M.L.; ESCARTIN, E.F. Colonization of tomatoes by *Salmonella montevideo* is affected by relative humidity and storage temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n.1, p. 30–34, janeiro 2007.

KIM, S. Y. et al.. Comparison of molecular and total ATP-based analytical methods with culture for the analysis of bioaerosols. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 9, p. 1732 – 1737, abril 2011.

KIMMICH, G. A.; RANGLES, J.; BRAND, J. S. Assay of picomole amounts of ATP, ADP, and AMP using the luciferase enzyme system. **Analytical Biochemistry**, Pennsylvania v. 69, n. 1, p. 187-206, novembro 1975.

KOO, O.K. et al. Comparison of cleaning fabrics for bacterial removal from food-contact surfaces. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 292-297, março 2013.

KRICKA, L.J.; THORPE, G.H.G. Chemiluminescent and Bioluminescent Methods in Analytical Chemistry. **Analyst**, v.108, p. 1274-1296, janeiro 1983.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. **Food Control**, Guildford, v. 36, n. 1, p. 153 – 158, março 2014.

KUSHWAHA, K.; MURIANA, P.M. Analysis of tissue invasiveness of adherent strains of *Listeria monocytogenes* by in vivo mouse assay. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 1–2, p. 1-136, junho 2010.

LAPPALAINEN, J. et al.. . Microbial testing methods for detection of residual cleaning agents and disinfectants—prevention of ATP bioluminescence measurement errors in the food industry. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 2, p. 210–215, fevereiro 2000.

LARSON, E.L. et al. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 6, p. 735– 739, dezembro 2003.

LEVIN, G. L., CHEN, C., DAVIS, G., Development of the firefly bioluminescent assay for the rapid quantitative detection of microbial contamination of water. **Aerospace Medical Research Laboratorie**, Ohio, p. 1-73, maio 1967.

LEVIN, G. V. et al.. A Rapid Method for Detection of Microorganisms by ATP Assay: Its Possible Application in Virus and Cancer Studies, **BioScience**, Washington D.C., v. 14, n. 4, p. 37- 38, 1964.

MARRIOTT, N. G.; GRAVANI, R. B **Principles of food sanitation**. New York, NY: Springer, 2006.

McCAPRA, F. Chemical Mechanisms in Bioluminescence. **Accounts of Chemical Research**, Washington, D.C., v. 9, n. 6, p. 201 – 208, junho 1976.

McElroy, W. D. The energy source for bioluminescence in an isolated system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington D.C., v.33, n. 11, p. 342–345, novembro 1947.

McElroy, W. D. Properties of the reaction utilizing adenosinetriphosphate for bioluminescence. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland , v. 191, n.2, p. 547–557, agosto 1951.

MOROZ, N.A.; GURSKII, D.YA.; UGAROVA, N.N. Stabilization of ATP Reagents Containing Firefly *L. mingrelica* Luciferase by Polyols. **Moscow University Chemistry Bulletin**, Moscow, v 63, n 2, p. 67-70, 2008.

NEWELL, D.G. et al.. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 1, p. S3–S15, maio 2010.

NORWOOD, D.E.; GILMOR, A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilm as a function of temperature. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.33, n.1, p. 320-334, 2001.

NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 257-269, maio 2010.

OGDEN, K. Practical experiences of hygiene control using ATP-Bioluminescence. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, n. 1, p. 389-393, 1993.

OLIVEIRA, A.G. et al.. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química Nova**, São Paulo, v.36, n. 2, p. 214 – 319, 2013.

PACIELLO, L. et al.. Strengths and weaknesses in the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability by ATP-based bioluminescence assay. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n.3, p. 157– 162, março 2013.

PARK, C.W. et al. Real-time monitoring of bioaerosols via cell-lysis by air ion and ATP bioluminescence detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, n.1, p. 379-383, fevereiro 2014

PENG, C. T. In: NOUJAIM, A. A.; EDISS, C.; WEIBE, L. I. **Liquid Scintillation: Science and Technology**, New York: Academic Press, p. 315, 1976.

POIMENIDOU, S. et al.. *Listeria monocytogenes* Attachment to and Detachment from Stainless Steel Surfaces in a Simulated Dairy Processing Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 75, n. 22, p. 7182-7188, novembro 2009.

RATPHITAGSANTI, W. et al.. High-throughput detection of spore contamination in food packages and food powders using tiered approach of ATP bioluminescence and real-time PCR. **LWT – Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 341–348, abril 2012.

RODA, A. et al.. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 22, n.6, p. 295-303, junho 2004.

RENIER, S.; HEBRAUD, M.; DESVAUX, M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Grampositive foodborne pathogen. **Environmental Microbiology**, v. 13, n.4, p. 835-850, abril 2011.

SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F.; COSTA, M.F.D. Revisão: quimioluminescência e bioluminescência. **Química Nova**, São Paulo, v.16, n. 1, p. 200-209, 1993.

SCALLAN, E. et al.. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n.1, p. 7-15, 2011.

SELIGER, H. H. Some reflections on McElroy and bioluminescence. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, New York, v. 4, n.1, p. 26-28, julho 1989.

SHAMA, G.; MALIK, D.J. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 3. P. 115 – 125, março 2013.

SHIMOMURA, O. **Bioluminescence: Chemical Principles and Methods**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 2006, p. 17 – 27.

SIMPSON, W.J., et al.. Brewery process control and the role of 'instant' microbiological techniques. In: Wijngaarden, M. V. **Proceedings of the European Brewery Convention**, Zürich: IRL Press, 1990, p. 663.

SOMERS, E. B.; WONG, A. C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 10, p. 2218-2229, outubro 2004.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, Guildford, v. 31, n. 2, p. 572-585, junho 2013.

STEVANI, C.V. et al. Current status of research on fungal bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 6, p. 1318 – 1326, agosto 2013.

SUBRAMANI, S.; DELUCA, M. Applications of the firefly luciferase as a reporter gene. In: SETLOW, J.K. **Genetic Engineering: Principles and Methods**. New York: Plenum Press, 1988, p.75-89

TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 4, p. 259-270, julho 2004.

TAL, R.; DICKSTEIN, B.; SULMAN, F. G. ATP determination with the Tricarb scintillation counter. **Experientia**, v. 20, n. 11, p. 652, dezembro 1964.

THORNE, N.; INGLESE, J.; AULD, D. S. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 17, n.6, p. 646-657, junho 2010.

VAID,R.; LINTON, R.H.; MORGAN, M.T. Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. **Food Microbiology**, London, v.27, n.8, p. 979-84, dezembro de 2010.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 421-431, janeiro 2011.

VELAZQUEZ, M.; FEIRTAG, J.M. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n.7, p. 799-803, julho 1997.

VERRAN, J.; JONES, M. V. Problems of biofilms in the food and beverage industry. In: WALKER, J. T.; SURMAN, S.; JASS, J. (Eds.), **Industrial Biofouling**. Chichester, UK: John Wiley and Sons Ltd., 2000, p. 145-173.

VENKATESWARAN, K. et al.. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 3, p. 367-377, março 2003.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, maio 2000.

WILSON, T.; HASTINGS, J.W. Bioluminescence. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, California, v. 14, n.1, p. 197-230, dezembro 1998.

WHO. Health Topics. Foodborne diseases. Disponível em:
http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/. Acesso em: 15 outubro 2013.

YANG, H. Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on high-density polyethylene cutting board surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 5, p. 990 – 998, maio 2009.

ZOTTOLA, E.A. Special techniques for studying microbial biofilms in food systems. In: TORTORELLO, M.L.; GENDEL, S.M. **Food microbiological analysis: New Technologies - IFT basic symposium series**. New York: Marcell Dekker, 1997, p. 315 – 346.