SANIFICANTES QUÍMICOS NO CONTROLE DE BIOFILMES FORMADOS POR DUAS ESPÉCIES DE *Pseudomonas* EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

DANILA SOARES CAIXETA

2008

DANILA SOARES CAIXETA

SANIFICANTES QUÍMICOS NO CONTROLE DE BIOFILMES FORMADOS POR DUAS ESPÉCIES DE *Pseudomonas* EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora
Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da UFLA

Caixeta, Danila Soares.
Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável / Danila Soares Caixeta. – Lavras: UFLA, 2008.
75 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.
Bibliografia.

1. *Pseudomonas*. 2. Biofilme. 3. Sanificantes químicos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

DANILA SOARES CAIXETA

SANIFICANTES QUÍMICOS NO CONTROLE DE BIOFILMES FORMADOS POR DUAS ESPÉCIES DE *Pseudomonas* EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 20 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr. Alexandre Tourino Mendonça	**UNINCOR**
Prof. Dr. Eduardo Alves	**UFLA**
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	**UFLA**

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL

Dedico este trabalho, lapidado pelas dificuldades e impulsionado pelo desejo de acertar, aos meus pais, que me deram de presente a vida e condições para nela aflorar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que se fez presente em todos os momentos, transmitindo-me segurança necessária para enfrentar o meu caminho.

Aos meus pais, Omar e Dorinha, que, incondicionalmente, me apoiaram, me incentivaram e contribuíram para que mais esse sonho se concretizasse.

Aos meus irmãos, Fernando e Thiago, que compartilharam meus ideais, por meio de seu apoio, carinho e amor.

A Minéia e Alessandra, que muitas vezes ouviram e deram seu apoio.

Aos meus sobrinhos, Isabella e Otávio, que foram minha grande fonte de luz.

Ao meu maravilhoso noivo, Frederico, pelo incentivo e apoio nesse momento tão importante da minha vida.

A minha segunda família, Sr. Manuel (*in memoriam*), Dona Maria, Marcelo, Dirce e Brenda, que contribuíram para a realização deste trabalho por meio de seu apoio, carinho e incentivo.

A minha orientadora, Roberta Hilsdorf Piccoli, que me acolheu com respeito e contribuiu para a realização de meus ideais.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, que desde o início se mostraram solícitos para qualquer ajuda.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Cleube, Camila, Thales, Gustavo, Mariana, Victor, Suzana, Belami, Nélio, Gisele e Carolina, pelo apoio e incentivo.

Em especial ao Thiago, Danilo, Maíra, Simone, Alessandra e Dieyckson, que me acolheram com carinho e rapidamente se tornaram mais que

colegas, mas verdadeiros amigos. Sua amizade e conselhos foram preciosos para elaboração deste trabalho.

As colegas Tina, Sandra e Creuza, pela compreensão e solidariedade.

A Magda, Ivani, Eliane e Sr. Piano, pela atenção, paciência e amizade.

A todos do LME, por toda a ajuda prestada e boa vontade.

Aos professores Alexandre Tourino Mendonça, Eduardo Alves e Luiz Ronaldo de Abreu, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização da pós-graduação.

A todos, que anonimamente ou não, participaram desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 Formação do Biofilme.....	4
2.3 Estrutura e fatores que afetam a formação do biofilme.....	8
2.4 Superfícies envolvidas na formação do biofilme.....	13
2.5 Problemas ocasionados por biofilmes.....	14
2.6 Microrganismos envolvidos na formação do biofilme.....	15
2.6.1 Características gerais do gênero *Pseudomonas*.....	16
2.6.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*.....	18
2.6.1.2 *Pseudomonas fluorescens*.....	20
2.7 Mecanismos de resistência das bactérias.....	21
2.8 Métodos de avaliação de biofilmes.....	22
2.9 Sanificantes.....	24
2.9.1 Sanificantes químicos.....	26
2.9.1.1 Peróxido de Hidrogênio (H_20_2).....	27
2.9.1.2 Ácido Peracético.....	29
2.9.1.3 Dicloroisocianurato de Sódio.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Microrganismos padrões.....	33
3.2 Obtenção do inóculo.....	33
3.3 Higienização dos cupons.....	33

3.4 Adesão das células bacterianas..... 34
3.5 Enumeração das células aderidas..... 35
3.6 Sanificação..... 35
3.6.1 Peróxido de Hidrogênio 5%..... 35
3.6.2 Dicloroisocianurato de Sódio 200 mg/L..... 36
3.6.3 Ácido Peracético 0,2%..... 37
3.7 Análise dos cupons por microscopia eletrônica de varredura..... 37
3.8 Análise estatística..... 38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 41
5 CONCLUSÕES..... 62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 63
ANEXOS..... 73

RESUMO

CAIXETA, Danila Soares. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável.** 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A maioria das bactérias, em seu hábitat, vive em comunidades de diferentes graus de complexidade, geralmente compondo o biofilme. Uma vez instalado o biofilme, à resistência desses organismos sésseis aumenta, dificultando, assim, a ação dos sanificantes. Objetivou-se, com este estudo, avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável AISI 304, em presença de leite desnatado reconstituído, sob diferentes temperaturas, determinando a potencialidade da remoção dos biofilmes formados pelo uso de três sanificantes químicos e determinar qual o mais eficiente na remoção de biofilmes monoespécie. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG. As bactérias utilizadas foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. O número de células por mL de cada cultura foi quantificado utilizando-se curva padrão. Foram inoculados no leite cerca de 10^5 UFC/mL, tendo *P. fluorescens* sido incubada a 4 ºC e 7 ºC e *P. aeruginosa*, a 7 ºC e a 28 ºC, sob agitação branda (50 rpm). No teste de sensibilidade das células aderidas, foram utilizados peróxido de hidrogênio (5%), dicloroisocianurato de sódio (200 ppm) e ácido peracético (0,2%). Todo o experimento foi realizado em três repetições e as análises em triplicata. Os resultados mostraram que *Pseudomonas aeruginosa* a 28 ºC apresentou ótimo crescimento (10,4 Log UFC/mL), comparado a 3,7 Log UFC/mL e 4,2 log UFC/mL, para *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, a 7 ºC, respectivamente, utilizando como substrato o leite. Houve formação de biofilme apenas por *P. aeruginosa*, quando incubada a 28 ºC, com adesão de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, quando incubadas a 7 ºC. O dicloroisocianurato de sódio foi o sanificante mais eficiente na redução da adesão e biofilme por *P. aeruginosa* a 7 ºC e a 28 ºC, respectivamente. Em contrapartida, o peróxido de hidrogênio foi mais eficaz na redução da adesão de *P. fluorescens* a 7 ºC.

Comitê Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA (Orientadora), Eduardo Alves - UFLA (Co-Orientador).

ABSTRACT

CAIXETA, Danila Soares. **Chemical sanitizers in the control of biofilms formed by two species of *Pseudomonas* on surface of stainless steel.** 2008. 75 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Most of bacteria in their habitat live in communities of different degrees of complexity, in general composing biofilms. Once installed the biofilm, the resistance of these sessile organisms increases, making it difficult thus the action of sanitizers. It was aimed, with this study, to evaluate the capacity of adhesion and formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* on AISI 304 stainless steel surface, in the presence of reconstituted skimmed milk under different temperatures, determining the potentiality of removal of the biofilms formed by the use of three chemical sanitizers and determine which the most efficient in removing monospecies biofilm. The work was developed in the Food Microbiology Laboratory and Electron Microscopy and Ultrastructural Analysis Laboratory (LME) of the Federal University of Lavras (UFLA), MG. The utilized bacteria were *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. The number of cells per mL of each culture was quantified by utilizing standard curve. About 10^5 UFC/mL were inoculated into milk, *P. fluorescens* having been incubated at 4 ºC and 7 ºC and *P. aeruginosa* at 7 ºC and at 28 ºC, under mild shaking (50 rpm). In the sensitivity test of the adhered cells, hydrogen peroxide (5%), sodium dichloroisocianurate (200 mg/L) and peracetic acid (0.2%) were utilized. All the experiment was accomplished in three replicates and the analyses in triplicate. The results showed that P*seudomonas aeruginosa* at 28 ºC presented a optimum growth (10.4 Log CFU/mL), as compared with 3.7 Log CFU/mL and 4.2 log CFU/mL for *P. aeruginosa* and *P. fluorescens*, at 7 ºC, respectively, utilizing milk as substrate. There was a formation of biofilm only by *P. aeruginosa*, when incubated at 28 ºC, with the adhesion of *P. aeruginosa* and *P. fluorescens*, when incubated at 7 ºC. Sodium dichloroisocianurate was the most efficient sanitizer in reducing both adhesion and biofilm by *P. aeruginosa* at 7 ºC and at 28 ºC, respectively. As opposed, hydrogen peroxide was more effective in reducing the adhesion of *P. fluorescens* at 7 ºC.

Guidance Committee: Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA (Adviser), Eduardo Alves - UFLA (Co-Adviser).

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos compreendem a definição taxonômica que congrega grupos variados de organismos de dimensões microscópicas, que vivem na natureza como células isoladas ou em agregados celulares.

A maioria das bactérias, em seu hábitat, vivem em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a uma variedade de superfícies bióticas e, ou, abióticas, geralmente compondo o biofilme, que pode ser formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies.

A formação do biofilme ocorre por uma série de eventos seqüenciais, em que a adesão inicial de bactérias planctônicas à superfície é seguida por subseqüente proliferação e acúmulo de camadas de células e, finalmente, pela formação da comunidade microbiana, embebida em matriz de exopolissacarídeo produzida por si mesma. Apesar de tais propriedades, a adesão e a formação do biofilme são limitadas por características do microrganismo, do material aderente e do meio envolvendo o microrganismo, como pH, temperatura, tempo de agitação e uma variedade de outros fatores.

O leite é uma substância heterogênea, constituída de numerosos tipos de proteínas, gorduras, carboidratos, minerais, enzimas, alta quantidade de água e pH neutro. No entanto, tais propriedades favorecem o crescimento de muitas bactérias patogênicas e deteriorantes. *Pseudomonas* spp são, geralmente, representadas por mais de 10% da microflora extraída do leite, contudo, são os mais importantes psicotróficos que dominam a microflora do leite cru e pasteurizado no tempo de deterioração.

Na indústria alimentícia, a adesão de microrganismos à superfície de equipamentos utilizados para o processamento de alimentos resulta em graves problemas, uma vez que o biofilme microbiano tem o potencial de atuar como

fonte crônica de contaminação que pode comprometer a qualidade do alimento e representar graves riscos à saúde pública.

Uma vez instalado o biofilme, a resistência desses organismos sésseis aumenta, dificultando, assim, a ação dos sanificantes.

A utilização de adequados e eficientes sanificantes em equipamentos, sejam eles químicos ou físicos, para a manutenção da qualidade dos alimentos, pode evitar a formação de biofilmes e ou reduzir os índices de contaminação por microrganismos. No entanto, como a eliminação de biofilmes em superfícies é uma tarefa exigente e difícil, o procedimento de higienização deve ser analisado como um todo, otimizando os resultados e minimizando os custos.

Objetivou-se, com a realização deste estudo, avaliar a capacidade de adesão e de formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 em aço inoxidável AISI 304, em presença de leite desnatado reconstituído sob diferentes temperaturas, determinando a potencialidade da remoção dos biofilmes formados pelo uso dos sanificantes químicos peróxido de hidrogênio (H_20_2), dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético e determinar o mais eficiente na remoção de biofilmes monoespécies.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

O conceito de biofilme tem emergido gradualmente de observações científicas durante extenso período de tempo, porém, nas últimas duas décadas, essa concepção tem avançado significantemente.

As primeiras observações de biofilmes foram realizadas por Antonie van Leuwenhoek que, observando amostras de dente, em seu primitivo microscópio, notou mais fragmentos de células agregadas do que planctônicas. A capacidade das bactérias de formar complexas comunidades e viver predominantemente em agregados foi estudada desde os tempos de Robert Koch. Porém, a primeira descrição detalhada de aderência microbiana em superfícies foi feita por Zobell, em 1943 e, somente em 1970, a palavra biofilme foi introduzida na literatura científica (Pizzolitto et al., 2001; Costerton & Wilson, 2004).

Nos anos 1980, os biofilmes foram largamente estudados por representarem anomalias e problemas que não podiam ser entendidos usando o conceito de bactéria como célula planctônica. Enquanto alguns microbiologistas estavam interessados em resolver os problemas e as anomalias nos sistemas naturais e industriais, alguns pesquisadores das áreas médica e odontológica aplicaram conceitos em seus sistemas de interesse, pois alguns organismos estavam freqüentemente envolvidos com a contaminação de aparelhos e infecções bacterianas crônicas (Costerton & Wilson, 2004).

Com o avanço de novas técnicas para a identificação de biofilme, esse estado agregativo celular vem sendo cada vez mais pesquisado, principalmente devido à grande importância nas atividades humanas, à qual pode trazer tanto benefícios quanto malefícios.

Os biofilmes têm importância em várias atividades, como o uso em estações de tratamento de águas ou de efluentes, removendo organismos patogênicos e reduzindo a quantidade de matéria orgânica; na produção de vinagre e de ácido cítrico; em aplicações farmacêuticas pela produção de metabólitos secundários e em processos biológicos, para a extração de metais a partir de minério. Em contrapartida, o crescimento indesejável de biofilmes tem impacto negativo em várias atividades, como, por exemplo: estragos em equipamentos devido a biocorrosão, contaminação de produtos alimentícios,; perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, diminuição da transferência de calor, perdas de pressão em tubulações e, ou, em equipamentos e perdas significativas para a indústria, em âmbito global (Pizzolitto et al., 2001).

Para se considerar que células aderidas constituem um biofilme, Andrade et al. (1998) sugerem que seja necessário o número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2, enquanto Ronner & Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2, respectivamente.

2.2 Formação do biofilme

A teoria de formação de biofilme tem evoluído ao longo de vários anos de pesquisa. Uma das primeiras teorias foi descrita por Marshall et al. (1971), sugerindo que a formação do biofilme é um processo que ocorre em duas fases, sendo, na primeira, o processo ainda reversível, em função da adesão do microrganismo na superfície, que ocorre por forças de Van der Walls, interações hidrofóbicas e atração eletrostática. Durante esse estágio, a bactéria apresenta movimento browniano, podendo ser removida simplesmente por rinsagem. Na segunda etapa, por meio de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas e covalentes e interações hidrofóbicas, ocorre à interação física

da célula com a superfície, com a produção de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix. Nesse processo, as fímbrias poliméricas ligam à célula bacteriana ao substrato, tornando difícil à remoção do biofilme, sendo necessário adotar forças mecânicas, como lavagem ou raspagens.

Mittelman (1998) e Dunne Júnior (2002) consideram que a adesão bacteriana e a formação do biofilme acontecem em três estágios. O primeiro consiste na cobertura rápida da superfície com filmes de condicionamento orgânico, que pode ser de componentes protéicos do sangue, como albumina, substâncias húmicas de ambientes aquáticos e componentes protéicos do leite. Durante o segundo estágio de adesão, células bacterianas simples são transportadas para a superfície e laços reversíveis são formados entre a parede celular e o substrato. A adesão primária entre a bactéria e as superfícies abióticas, geralmente, é mediada por interações inespecíficas (forças hidrofóbicas), enquanto a adesão a tecidos vivos ou deslizantes é mediada por moléculas específicas (lectinas, ligantes ou adesinas). O terceiro estágio, a maturação, consiste de filme de condicionamento orgânico, em que sucessões de bactérias colonizadoras ligam-se ao seu exopolissacarídeo e a várias partículas detritivas.

Um modelo comum para a formação de biofilme propõe que o processo ocorre em cinco estágios. Primeiramente, ocorre o ataque reversível de bactérias planctônicas que se aproximam da superfície sólida por fluxo fluido ou por motilidade, que tem domínio sobre as forças repulsivas entre a célula e a superfície. Geralmente, a superfície sólida é condicionada, ou seja, pode ser modificada por adsorção de vários solutos e ter suas propriedades alteradas. No segundo estágio, ocorre a transição do ataque reversível para não reversível, pela produção de polímeros extracelulares pela própria bactéria e, ou, por adesinas específicas localizadas na pili ou fímbrias, que interagem com a superfície. O

terceiro estágio consiste no desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. O quarto estágio refere-se ao desenvolvimento de microcolônias dentro do biofilme maduro; por outro lado, substâncias poliméricas extracelulares, que servem como matriz adesiva e nutrientes, podem continuar a ser formadas, bem como canais de água e poros. No estágio final, ocorre a dispersão de células do biofilme e o retorno de células planctônicas (van Houdt & Michiels, 2005) (Figura 1).

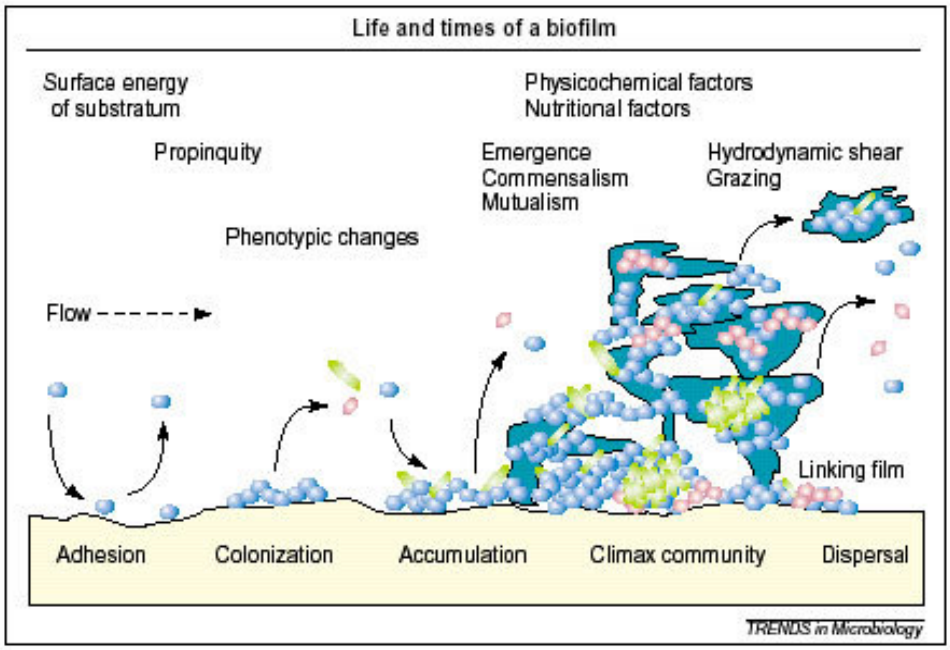

FIGURA 1 Arquitetura de um biofilme formado por espécies múltiplas (Kyain, 2008).

O desenvolvimento do biofilme e a desadesão podem ser regulados por expressão de genes dependente da densidade populacional, controlada por

moléculas sinalizadoras de célula a célula, tais como homoserina lactona aciladas (AHLs) em bactérias Gram-negativas e peptídeos específicos para bactéria Gram-positivas (van Houdt & Michiels, 2005). Existem várias propostas para explicar o desprendimento de células do biofilme. Tais processos envolvem a desadesão ativa pela clivagem de enzimas de polímeros da matriz ou mudanças na fisiologia de células aderida. Existem sugestões que tais mecanismos de desadesão podem estar associados com o ciclo de divisão de células individuais de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Allison et al., 1998).

A dinâmica de formação do biofilme é decorrente de vários fatores, no entanto, a matriz extracelular ou glicocálix representa importante papel na fisiologia e na persistência do biofilme (Kives et al., 2006). A composição da matriz extracelular é complexa e varia entre diferentes espécies bacterianas ou, mesmo, dentro da mesma espécie, sob diferentes condições ambientais. Apesar da heterogeneidade, o exopolissacarídeo é considerado componente essencial da matriz, assim como algumas proteínas de superfície que, por sua vez, têm sido relacionadas principalmente à adesão inicial das células microbianas à superfície (Lasa & Penadés, 2006).

Os exopolissacarídeos produzidos por grande variedade de microrganismos são gomas hidrossolúveis que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes. A estrutura de muitos polissacarídeos de bactérias Gram-negativas é relativamente simples, sendo formados de homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos. Este é normalmente composto de unidades repetidas e alinhadas de diferentes dissacarídeos até monossacarídeos e muitos contêm grupos acetila e piruvato (Souza & Garcia-Cruz, 2004).

Alguns exopolissacarídeos são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano, enquanto que outros são sintetizados somente durante a fase logarítmica ou estacionária. Portanto, sua síntese ocorre intracelularmente

utilizando açúcares nucleotídeos difosfatados. Geralmente, sua produção é induzida pela limitação de um nutriente essencial, que não seja fonte de carbono ou outra fonte de energia (Souza & Garcia-Cruz, 2004).

Exopolissacarídeos são considerados componentes chaves que determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme microbiano, agregado pela formação tri-dimensional, aspecto de gel, alta hidratação e canais localizados na matriz do biofilme, em que os microrganismos são imobilizados (Tielker et al., 2005). Além do mais, age como adesivo e barreira defensiva, protegendo as células para que não sejam destacadas pelo fluxo de substâncias, auxiliando a célula a resistir a condições de estresse múltiplo, tais como a diminuição e a exaustão de nutrientes e água, a presença de biocidas e outros agentes antimicrobianos e condições ambientais (Kives et al., 2006).

Alguns estudos reconhecem a habilidade de bactérias, tais como *Salmonella* Thyphimurium, *Escherichia coli* e *Gluconacetobacter xylinus*, em produzir celulose extracelular; nos dois primeiros organismos, tal componente é crucial na matriz extracelular. Em adição à celulose, a presença de outros componentes também é de grande importância na matriz extracelular, como, por exemplo, a adesina intercelular polissacarídica estafilococica (PIA), que é produzida por enzimas codificadas pelo *locus ica* e o alginato, polímero rico em glicose ou mannose, ambos encontrados em biofilme por *P. aeruginosa* (Branda et al., 2005).

2.3 Estrutura e fatores que afetam a formação do biofilme

Na década de 1980, houve a suposição de que os biofilmes fossem representados por simples estrutura plana, principalmente 2D, com espessura relativamente constante (Wimpenny et al., 2000). No entanto, o interesse de pesquisadores de várias áreas levou à investigação de diversos sistemas de biofilme, utilizando vasto leque de técnicas. Este estudo multidisciplinar

originou a descrição de vários tipos de estruturas de biofilmes e a formulação de modelos conceituais.

Após várias investigações, tornou-se possível inferir que existem, no mínimo, três estruturas diferentes de biofilme. A primeira é a tradicional, plana, visão homogênea da estrutura do biofilme. Tal visão foi possível a partir de observações de placas dentárias, utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Exemplos de tais biofilmes foram publicados por Nyvad & Fejerskov (1997). A segunda observação foi feita por Keevil & Walker (1992), utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), para examinar amostras crescidas em superfícies internas de sistema de distribuição de água. Esses pesquisadores perceberam montes constituídos de microcolônias de bactérias ligadas umas às outras por substância polimérica extracelular e apresentando colunas envolvidas por fase líquida em que protozoários podiam ser notados. Essa estrutura foi definida por tais autores como: "Modelo do Mosaico Heterogêneo". O terceiro tipo de biofilme representa o modelo na forma de cogumelo ou tulipa, com estrutura porosa, com canais capilares de água, por onde ocorre a distribuição de nutrientes e água (Poulsen, 1999).

Usando microscopia a laser confocal (CLSM), para verificar a formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Vibrio parahaemolyticus*, Lawrence et al. (1991) observaram que *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* continham estruturas de cogumelo, enquanto que *Vibrio parahaemolyticus* apresentou extensas regiões ovóides em seu interior.

A presença de poros no interior do biofilme tem várias funções. Primeiro, o transporte facilitado com difusão passiva ou com o auxílio de água ocorre através de capilaridade especial, em que o transporte de moléculas no interior do biofilme e a perda celular são secretados através desses canais. Acredita-se, ainda, que os canais de água participem no transporte de oxigênio no interior do biofilme, portanto, a limitação da difusão e o consumo de

oxigênio resultam no baixo conteúdo de oxigênio no interior do biofilme, demonstrando, assim, que microrganismos aeróbios e anaeróbios podem viver juntos no biofilme.

Além das diferenças estruturais que os biofilmes podem ter, estes apresentam heterogeneidade em sua constituição. Segundo Laspidou & Rittmann (2004), o biofilme tem três tipos de heterogeneidade. O primeiro corresponde ao tipo de espécie microbiana que constitui o biofilme, enquanto a segunda e a terceira formas de heterogeneidades são a densidade da biomassa e a força física. Densidade de biomassa é a concentração de componentes sólidos que formam o biofilme, enquanto a força física determina a habilidade de resistir às forças de desadesão.

A adesão da bactéria à superfície é um dos primeiros passos para a instalação do biofilme, no entanto, condições ambientais, tais como velocidade do fluxo, temperatura, pH, disponibilidade e conteúdo de nutrientes, hidrofobicidade celular, mobilidade, estrutura celular, incluindo EPS e flagelo, concentração iônica, fase de crescimento da célula e concentração de células suspensas, bem como a aspereza da superfície, são capazes de influenciar na formação e nas propriedades do biofilme (Chen et al., 2005; Oulahal et al., 2008).

Em alguns casos, o crescimento do biofilme é também limitado pela expressão de moléculas do quorum-sensing, liberadas em resposta à limitação de nutrientes, a acumulação de produtos tóxicos e por vários outros fatores (Dunne Júnior, 2002).

Segundo Brower et al. (1996), a adsorção de macromoléculas solúveis, como proteína, sob a superfície sólida também pode influenciar na adesão microbiana. Dessa maneira, podem ocorrer várias alterações nas propriedades da interface superfície/fluido, inibindo ou facilitando a colonização bacteriana ou,

ainda, disponibilizando componentes dissolvidos com alta afinidade pela superfície.

Barnes et al. (1999) demonstraram que uma variedade de proteínas, incluindo proteínas do leite, tem a capacidade de afetar a adesão bacteriana em superfícies de poliestireno, hidroxi-apatita, vidro, borracha, aço inoxidável, sílica e implantes médicos. A superfície de aço inoxidável tratada com leite desnatado mostrou redução na adesão de *S. aureus*, *Serratia marcescens* e *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e *Pseudomonas fragi* mostraram pouca adesão nas superfícies limpas e pré-tratadas (menos de um organismo/campo de visão). Pré-tratamentos conduzidos com proteínas individuais do leite α, β e k-caseína e α-lactoalbumina, em concentrações iguais, apresentaram redução na adesão de *S. aureus* comparadas com adesão de superfície não tratada, tendo a α-lactoalbumina tido maior efeito. Pôde-se observar também efeito similar com *L. monocytogenes*.

Vários estudos vêm demonstrando a importância da hidrofobicidade da superfície no processo de adesão. A hidrofobicidade representa o grau de capacidade de molhadura da superfície em meio aquoso, sendo a adesão favorecida pelas superfícies hidrofóbicas, as quais possam entrar em contato pela compressão da camada de água e das mesmas (Sousa, 2005).

A motilidade é, usualmente, considerada fator de virulência de bactérias patogênicas, uma vez que está envolvida na colonização de organismos hospedeiros ou alvos, onde promove o contato inicial da célula à superfície. O flagelo tem importante papel na motilidade e na quimiostase na formação do biofilme, portanto, a inibição da biossíntese do filamento flagelar por inserção de agente mutante no gene *fliC* (codifica flagelina, o principal componente do filamento flagelar) ou *fliDC* (codifica o precursor dos reguladores requeridos para a expressão de todos os outros genes do regulador flagelar) e a deleção de *motA* (produz um condutor de prótons, componente essencial para gerar a

rotação do flagelo) e ou *motB* (codifica o peptideoglicano na ancoragem do corpo basal, que é requerido para a rotação do flagelo) podem resultar em um flagelo paralisado. Em conclusão, a presença do flagelo e sua funcionabilidade são indispensáveis para a adesão inicial de *E. coli* em superfície e também para sua sobrevivência. Porém, para linhagens que produzem *curli* e para linhagens que possuem o plasmídio F da conjugação, tal adereço é dispensável (van Houdt & Michiels, 2005).

Curli são apêndices de filamentos proteináceos de heteropolímeros compostos por duas subunidades uma maior e outra menor, que influencia nas propriedades de aderência de várias linhagens de *E. coli* que formam biofilme, incluindo *E. coli* produtora de toxina *shiga*. Em isolados clínicos de *E. coli*, *curli* são expressos em muitas linhagens enterohemorrágica e enterotoxigênica, mas não ocorrem em linhagens enteroinvasiva e enteropatogênica, sugerindo papel específico na patogenicidade (van Houdt & Michiels, 2005).

Recentes estudos demonstraram que, apesar do fato de *P. aeruginosa* ter apenas um flagelo e um motor, o genoma de algumas linhagens codifica dois estatores flagelares, sendo este um elemento estático no motor bacteriano, promovendo energia para girar esse apêndice e proporcionar movimento à célula no ambiente (Toutain et al., 2007).

Os estatores estão envolvidos na motilidade *swimming* (natatória) e *swarming*, mas não representa nenhum papel na terceira motilidade utilizada por *P. aeruginosa*, que é motilidade *twitching* (contração) dependente do pili tipo IV. Motilidade *swimming* em *P. aeruginosa* requer flagelo funcional, enquanto que *swarming* requer, além do flagelo funcional, a produção de um surfactante rhamnolípidico, que age como agente umectante da superfície e sinal. Em *P. aeruginosa* PA14, os estatores MotAB e MotCD são redundantes na motilidade *swimming*, porém, na motilidade *swarming*, o estator MotAB é dispensável, mas o MotCD é requerido para a sua sobrevivência (Toutain et al., 2007).

Pili representa também importante papel na formação de biofilme, mas a natureza precisa e o impacto no desenvolvimento do mesmo variam com as condições ambientais, como, por exemplo, o pili tipo IV em *P. aeruginosa* é responsável por mediar a adesão à superfície e a motilidade *twitching*. Em meio mínimo adicionado de glicose, cultura padrão com ausência do pili tipo IV adere normalmente a superfícies abióticas, mas células individuais não têm a capacidade de formar microcolônias. Em culturas de células em fluxo usando meio mínimo com glicose, a formação de colônias ocorre pelo crescimento clonal, independente do pili tipo IV. Em contraste, em células em fluxo usando meio mínimo adicionado de citrato, o crescimento de microcolônias é seguido da difusão ao longo do substrato, para formar biofilme plano, por outro lado, linhagens com ausência do pili formam microcolônias, mas não se espalham sobre a superfície (Branda et al., 2005).

2.4 Superfícies envolvidas na formação do biofilme

Grande diversidade de microrganismos são capazes de aderir e formar biofilme em superfícies biótica e abióticas, incluindo lentes de contato, cascos de navios, encanamento em indústrias de alimentos e petróleo, pedras em cursos d`água e sílica, aço inoxidável, vidro, alumínio, teflon, materiais de náilon e borracha encontrados em ambientes utilizados para processar alimentos e em uma variedade de implantes e aparelhos transcutâneos (Dunne Júnior, 2002; Resende, 2005).

As características macroscópicas e, particularmente, as microscópicas das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos por microrganismos alteradores ou patogênicos (Andrade, 2004). A microtopografia da superfície pode dificultar os procedimentos de limpeza, quando fendas e outras imperfeições criam condições para abrigar as células.

O material mais frequentemente usado na indústria de alimentos é o aço inoxidável AISI 304, cuja composição química é C - 255 ppm; Si - 0,44; Mn - 1,13; Cr - 18,23; Ni - 8,91; Cu - 0,23; N - 474, valores dados em % de peso (Castro et al., 2007). Assim como o vidro, quando comparado a polímeros, borracha e alumínio, o aço inoxidável apresenta maior resistência a agentes oxidantes e outros agentes sanificantes, como ácido peracético, hipocloritos e iodóforos (Rossoni & Gaylarde, 2000). Por outro lado, é vulnerável à corrosão localizada, por íons clorados e componentes sulfurosos reduzidos, enquanto superfícies emborrachadas são propensas à deterioração e podem desenvolver rachaduras onde as bactérias podem se acumular (Ismail, et al., 1999).

2.5 Problemas ocasionados por biofilmes

Biofilmes microbianos estão atraindo a atenção de cientistas em diversas áreas, tais como nos campos da medicina, ambiente aquático, indústria farmacêutica e, principalmente, indústria de processamento de alimentos.

Em particular, nas indústrias alimentícias, os efeitos da colonização das superfícies onde se processam os alimentos podem resultar em vários problemas, seja de ordem econômica ou de saúde pública. No quesito econômico, bactérias deteriorantes podem contaminar produtos alimentícios, alterando suas características e levando a perdas econômicas, portanto, o risco à saúde pública consiste no problema mais grave, pois o biofilme pode ser fonte de contaminação crônica e veicular microrganismos patogênicos (Ribeiro-Furtini, 2005). De acordo com o *Center For Disease Control* nos EUA, as bactérias são responsáveis pela ocorrência de cerca de 70% dos surtos e 95% dos casos de toxinfecções alimentares (Andrade et al., 2003). Segundo Freitas (1995), há relatos de que utensílios e equipamentos contaminados participam do aparecimento de, aproximadamente, 16% dos surtos.

Para não colocar em risco a saúde dos usuários, com a veiculação de microrganismos patogênicos, deve-se controlar a contaminação, a multiplicação e a sobrevivência microbiana nos diversos ambientes, tais como equipamentos, utensílios e manipuladores, o que contribuirá para a obtenção de alimentos com boa qualidade microbiológica.

Em sistemas de distribuição de água potável, 95% da biomassa está localizada nas paredes das tubulações e menos de 5% nas fases da água. Dessa maneira, a formação de biofilme pode gerar vários problemas operacionais, incluindo corrosão das tubulações, perda da qualidade da água e uma série de outros eventos indesejáveis (Hu et al., 2005).

Dependendo do local da adesão, alguns microrganismos podem ser submetidos a condições de ausência de oxigênio, nutriente ou espaços para multiplicar-se. A ausência de oxigênio pode conduzir à formação de uma zona anóxica, onde condições anaeróbicas prevalecem e bactérias fermentativas são particularmente ativas. Os microrganismos anaeróbios formam ácidos orgânicos de baixo peso molecular e ácidos graxos, bem como produtos de dióxido de carbono e hidrogênio, que estimulam o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, que podem conduzir a problemas de corrosão de metais (Poulsen, 1999).

2.6 Microrganismos envolvidos na formação do biofilme

O biofilme pode ser formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, ou seja, quando o biofilme é composto por espécies heterogêneas, os produtos metabolizados por uma espécie podem servir de suporte para o crescimento de outras, enquanto a adesão de algumas espécies pode fornecer ligantes que promovem a ligação de outras. Por outro lado, a competição por nutrientes e o acúmulo de produtos tóxicos produzidos pelos colonizadores primários podem limitar a diversidade de espécies no interior do biofilme (Dunne Júnior, 2002). Estima-se que, em um biofilme dental, existam

mais de 500 diferentes bactérias, nos estágios tardios da doença (Mah & O'Toole, 2001).

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, podem-se ressaltar: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp. e *Enterecoccus faecium* (Criado et al., 1994; Leriche & Carpentier, 1995; Andrade et al., 1998). Como exemplos de patogênicos, Leriche & Carpentier (1995); Smith & Fratâmico (1995) e Surman et al. (1996) citam *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica, Salmonella* Thyphimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

2.6.1 Características gerais do gênero *Pseudomonas*

Bactérias do gênero *Pseudomonas* participam dos processos de adesão e formação de biofilme, causando graves prejuízos a diferentes superfícies de ambientes alimentares, domésticos e áreas institucionais. Na indústria de alimentos, constituem risco higiênico e causam perdas econômicas, enquanto que, na medicina, contribuem para o aumento de riscos de infecções, devido ao seu crescimento em implantes, cateteres e outros dispositivos médicos.

O gênero *Pseudomonas* pertence à família das Pseudomonadaceae, é Gram-negativa, aeróbia, não formadora de endósporos, possui a forma de bastonete reto ou ligeiramente curvo e, principalmente, um modo de inserção polar dos flagelos que lhe confere mobilidade.

Muitas têm a capacidade de excretar pigmentos extracelulares, solúveis em água que difundem no seu próprio meio, sendo os pigmentos solúveis mais notórios a pioverdina e a piocianina. No entanto, algumas cepas podem produzir pigmentos vermelho-escuro ou preto, que recebem o nome de piorrubina e piomelanina, respectivamente. Nesse gênero estão incluídas espécies

fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, entre outras) e não-fluorescentes (*P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes* e *P. alcaligenes*, entre outras) (Nouér, 2005).

Pseudomonas tem requerimentos nutricionais simples e crescem quimiorganotroficamente em pH neutro e a temperaturas na gama mesofílica. No entanto, a temperatura ótima de crescimento da maior parte das estirpes é de, aproximadamente, 28 ºC. Uma de suas propriedades é a variedade de componentes orgânicos usados como fontes de carbono e como doadores de elétrons para a produção de energia. Algumas espécies utilizam mais de 100 diferentes componentes e outras menos de 20. Os membros desse gênero, em geral, são incapazes de hidrolisar compostos poliméricos nos seus monômeros constituintes e, por esse motivo, atuam somente após a despolimerização ter sido levada a cabo por outros microrganismos (Madigan et al., 1997; Sillankorva, 2004).

O metabolismo de *Pseudomonas* é tipicamente respiratório, sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons. No entanto, em alguns casos, o nitrato pode ser usado como aceptor alternativo de elétrons, permitindo que, nesses casos, o crescimento ocorra em condições de anaerobiose (Sillankorva, 2004).

Pseudomonas spp são importantes bactérias que contribuem para a deterioração de leite pasteurizado, agindo de duas maneiras. Elas produzem a maioria das enzimas lipolíticas e proteolíticas, secretadas quando o leite cru é armazenado e algumas dessas enzimas podem permanecer mesmo após o processo de pasteurização (72 ºC por 15 segundos) ou a tratamentos com altas temperaturas (143 ºC por 3 segundos), o que pode, posteriormente, reduzir a qualidade sensorial e a vida de prateleira do produto. *Pseudomonas* spp podem agir em procedimentos de pós-pasteurização, causando deterioração do leite pasteurizado durante o armazenamento sobre refrigeração (Wiedmann et al., 2000).

2.6.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é de ambiente ambíguo, sendo encontrada em uma série de hábitats, podendo ser observada como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade por possuir flagelo polar monotríqueo. Além disso, não é fermentadora de carboidratos, é produtora de 3-citocromo-oxidase, utiliza o nitrato em substituição ao oxigênio como aceptor final de elétrons, produzindo também arginina dehidrolase e ornitina-descarboxilase (Ferreira, 2005) (Figura 2).

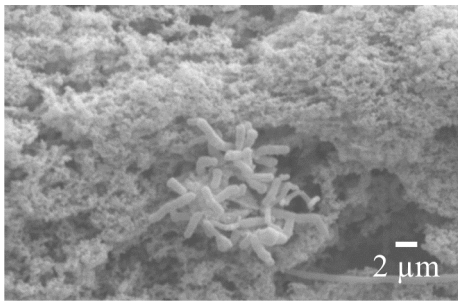

FIGURA 2 Eletromicrografia de varredura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cultivada em leite desnatado reconstituído.

O termo "*aeruginosa"* se refere à característica da coloração azul esverdeada, formada pelas culturas devido à produção de piocianina (Nouér, 2005).

Grande número de componentes extracelulares e de superfície sintetizados por *P. aeruginosa* contribui para a sua virulência, mas a capacidade de aderir a superfícies inanimadas e biológicas é importante estágio na infectividade. A bactéria adere a partes externas dos implantes, migra ao longo

da superfície para o interior do corpo e causa várias infecções ou a destruição dos implantes (Cappello & Guglielmino, 2006).

Biofilmes são responsáveis por 60% das infecções humanas, no entanto, o tratamento com antimicrobianos torna-se cada vez mais difícil de erradicar, uma vez que a agregação microbiana aumenta de 10-100 vezes a tolerância a antibióticos (Harrison et al., 2005; Abdi-Ali et al., 2006).

No contexto da formação de biofilme, *P. aeruginosa* tem sido um organismo modelo, porém, o desenvolvimento do mesmo varia de acordo com as condições nutricionais e ambientais (Haubler, 2004).

No estágio inicial do desenvolvimento do biofilme, *P. aeruginosa* usa o flagelo para aderir à superfície e formar monocamada de células. Subseqüentemente, o pili tipo IV permite à bactéria mover-se na superfície, formando microcolônias. Vale ressaltar que, nesse contexto, o pili tipo IV é requerido para gerar translocação na superfície, denominado como *twitching motility* (mobilidade de contração). Finalmente, a redução do flagelo e a produção de uma matriz de exopolissacarídeo são necessárias para estabilizar a estrutura tridimensional do biofilme (O′Toole et al., 2000).

O desenvolvimento da estrutura do biofilme de *P. aeruginosa* é dependente da fonte de carbono. Quando o citrato é utilizado como fonte de carbono, forma-se biofilme de superfície plana, que pode ser claramente diferenciado de biofilme crescido em glicose, contendo estrutura multicelular em formato de cogumelo, separado por canais preenchidos com água. Em modelo alternativo de biofilme de *P. aeruginosa* crescida em citrato, o flagelo não tem o papel de adesão e a formação inicial de microcolônias ocorre pelo crescimento clonal e mobilidade de contração, que posteriormente espalha-se sobre o substrato e impede a formação de larga estrutura de microcolônias (Haubler, 2004).

2.6.1.2 *Pseudomonas fluorescens*

Na indústria de alimentos, as *Pseudomonas*, particularmente linhagens psicotróficas de *P. fluorescens*, são as mais freqüentes deteriorantes de leite cru, estocados à temperatura de refrigeração, pois conseguem crescer a 4 ºC e degradar lipídios e proteínas que, por sua vez, causam alterações na cor, sabor e aroma do leite e derivados. Contudo, como essa bactéria possui dificuldade em crescer a 37 ºC, raramente é patogênica. No entanto, mesmo assim, pode contaminar sangue e derivados, sob refrigeração (Sillankorva, 2004; Kives et al., 2006) (Figura 3).

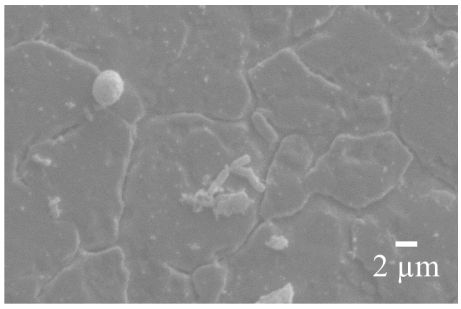

FIGURA 3 Eletromicrografia de varredura de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, cultivada em leite desnatado reconstituído.

Pseudomonas fluorescens possui tempo de geração pequeno em temperaturas de refrigeração, o que lhe confere vantagem em relação a outras bactérias Gram-negativas. Pesquisas mostram que o tempo de geração de *P. fluorescens* é de 30,2 horas, entre 0 °C e 2 ºC; 6,7 horas, entre 4 ºC e 6 ºC e 1,4 hora, a 20 ºC (Ribeiro-Furtini, 2005).

Segundo Figueiredo (2000), essa bactéria possui várias estratégias para iniciar a adesão a superfícies, sendo dependentes de sinais do meio ambiente.

Uma vez que o biofilme está formado, *P. fluorescens* pode criar reserva potencial de bactérias e resistir ao efeito de químicos e sanificantes, podendo, inclusive, contaminar tanques de refrigeração por expansão, quando liberada de um biofilme (Deeth & Touch, 2000).

A utilização de substratos, como leite e carne, em estudos de adesão em superfície de aço inoxidável com *P. fluorescens*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*, indicou que essas bactérias são mais resistentes quando formam biofilmes a partir de leite como substrato do que em caldo de carne, sendo os biofilmes formados, em ambos os casos, resistentes à sanificação (Wirtanen et al., 1996).

2.7 Mecanismos de resistência das bactérias

Resistência tem sido definida como a habilidade permanente ou temporária de um organismo e a progênie de permanecerem viáveis e, ou, multiplicar-se sob condições ambientais ou que inativam outros membros (Cloete, 2003).

As bactérias podem ser definidas como resistentes quando não são susceptíveis à determinada concentração de agente antibacteriano usado na prática. As bactérias podem sobreviver em ambientes nos quais há rápida mudança, bem como adaptar-se às mudanças repentinas na disponibilidade de nutrientes e nas defesas imunes primárias e secundárias do hospedeiro (Cloete, 2003; Jefferson, 2004). Tal resistência pode ser adquirida por mutação, aquisição de novas informações genéticas por meio da transferência horizontal de genes, expressão de genes silenciosos que freqüentemente é manifestada fisiologicamente e estruturalmente, mudanças na hidrofobicidade da superfície celular e em componentes da membrana externa envolvidos na aderência, tais como pili e lipopolissacarídeos (LPSs), crescimento em biofilme e outras alterações fenotípicas (Chapman, 2003; Cappello & Guglielmino, 2006).

Para Mittelman (1998), a formação do biofilme está associada à proteção contra tais mudanças, pois bactérias associadas aos biofilmes são mais resistentes a tratamentos com antibióticos do que células planctônicas. Além disso, as células sésseis possuem a defesa coletiva contra fatores antagônicos e o aumento da sobrevivência da colônia pela diferenciação em tipos distintos de células. Por exemplo, as colônias podem formar células distintas mais resistentes ao ataque por fagos, ao efeito de antibióticos e à dessecação (Leite et al., 2001).

As possíveis explicações para a resistência aumentada de biofilmes bacterianos incluem: difusão limitada de agentes antimicrobianos por meio da matriz do biofilme, interações de agentes antimicrobianos com a matriz (células e polímeros), resistência mediada por enzimas, níveis de atividade metabólica dentro do biofilme, adaptação genética e outras estruturas da membrana, ou seja, a resistência ocorre em função de vários fatores inter-relacionados, incluindo barreiras de difusão, atividade metabólica diferencial e ultra-estrutura da parede celular (Mittelman, 1998; Cloete, 2003).

2.8 Métodos de avaliação de biofilmes

O recente uso de técnicas moleculares tem possibilitado o monitoramento das comunidades de biofilmes bacterianos. Este envolve a identificação de afiliações filogenéticas, a determinação de distribuição espacial, o esclarecimento de funções e atividades e a coordenação estabelecida nos biofilmes. Tais métodos moleculares incluem: hibridização *in situ* de fluorescência (FISH), microautoradiografia combinada com FISH (MAR-FISH), microsensores combinados com FISH e reação em cadeia de polimerase (PCR), dentre várias outras técnicas combinadas com FISH (Aoi, 2002).

Além do uso de técnicas moleculares, têm-se utilizado vários outros métodos para enumeração e amostragem do biofilme, que podem ser divididos em dois grupos, os métodos visuais e métodos não visuais.

Como métodos visuais destacam-se a microscopia de luz, de contraste de fase, de epifluorescência e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Algumas outras técnicas, como microscopia de reflexão de interferência, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica a laser confocal, também têm sido consideradas importantes nos estudos de biofilme. Por outro lado, os métodos não visuais incluem a remoção de microrganismos da superfície, contagem por métodos convencionais microbiológicos (*swab*, rinsagem, raspagem, contagem padrão em placas, dentre outros) e medidas da impedância e de bioluminescência (Kumar & Anand, 1998).

A microscopia eletrônica é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme. A fixação das amostras é realizada utilizando-se agentes químicos, como glutaraldeído, paraformaldeído e ósmio, ou criofixadas, em que a amostra é rapidamente congelada para evitar danos às células pelos cristais de gelo (Costa, 1999).

A microscopia confocal é um dos métodos utilizados para observar a estrutura dos biofilmes. Ela permite efetuar seccionamento óptico do biofilme no seu estado hidratado de um modo não destrutivo, o que, conseqüentemente, permite obter informações 3D da estrutura. Essa técnica permite, ainda, adquirir imagens em canais múltiplos, o que pode ser utilizado para observação simultânea de várias sondas fluorescentes, de modo a obter informação espacial da diversidade funcional no biofilme (Lawrence & Neu, 1999). As características não invasivas da microscopia confocal permitem a investigação ao longo do tempo de biofilmes cultivados em células de fluxo (Palmer, 1999).

A microscopia de contraste é recomendada para acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real, numa superfície transparente. A microscopia de epifluorescência (EPF) é uma alternativa excelente na quantificação de células aderidas às superfícies. Para visualizar a adesão bacteriana, usam-se substâncias fluorescentes, como o alaranjado de acridina

para coloração direta das células, ou anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo sua observação (Costa, 1999).

A medida de impedância se baseia no princípio de que, ao se metabolizarem os componentes presentes no meio de cultura, os microrganismos transformam moléculas grandes em pequenas, que possuem cargas elétricas, o que leva à mudança da resistência ou impedância do meio. A mudança da condutividade pode ser medida e o número de microrganismos aderidos à superfície está relacionado com o valor obtido para a condutividade (Siley & Forsythe, 1996; Rule, 1997).

A técnica de bioluminescência baseia-se no conteúdo de trifosfato de adenosina (ATP). O ATP é gerado pela oxidação de moléculas alimentares, tais como glicose, ácidos graxos e aminoácidos. A quantidade de ATP em uma amostra pode ser medida por uma reação de bioluminescência entre a luciferina e a enzima luciferase, enquanto a quantidade de luz emitida pode ser medida por luminômetro, fluorímetro ou espectrofotômetro de cintilação líquida (Franco & Landgraf, 1996).

2.9 Sanificantes

A crescente preocupação com o tema qualidade de alimentos é notória e diversas ferramentas de garantia de qualidade têm sido utilizadas na intenção de oferecer produtos seguros e, ao mesmo tempo, para contemplar as exigências de comercialização. Além destes pontos, há também a diminuição de custos, gerada pela redução de perdas e a otimização da produção, dentre outros benefícios (Ribeiro-Furtini & Abreu, 2006).

A higienização é utilizada com o objetivo de preservar a qualidade microbiológica dos alimentos, pelo controle e pela prevenção da formação de biofilmes, auxiliando na obtenção de um produto que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, tenha boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo

risco à saúde do consumidor. A higienização ocorre em duas etapas distintas. A primeira corresponde à limpeza, que tem como objetivo principal à remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos à superfície, constituídos, principalmente, por proteínas, gorduras e sais minerais, e, posteriormente, a sanificação, para eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de alteradores a níveis aceitáveis (Macêdo & Barra, 2007).

O procedimento de limpeza pode remover 90% ou mais dos microrganismos associados à superfície, porém, não tem a capacidade de matá-los, o que pode, posteriormente, ocasionar a adesão de tais microrganismos em outras superfícies (Gibson et al., 1999). A sanificação é definida como a operação que visa à destruição de microrganismos a níveis toleráveis. Os sanificantes físicos ou químicos eliminam células vegetativas de microrganismos de importância para a saúde pública e outros não patogênicos encontrados nas superfícies de equipamentos, utensílios, manipuladores e dos ambientes.

Na sanificação por meios físicos, empregam-se calor e radiação ultravioleta, enquanto que, na sanificação por agentes químicos, utilizam-se compostos clorados, iodóforos, composto quartenário de amônia, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ou seja, utilizam-se desde ácidos orgânicos até agentes umectantes complexos (Cardoso, 1993; Cardoso et al., 2003).

A redução do número de microrganismos quando se utilizam sanificantes químicos depende, entre outras coisas, das propriedades microbicidas do agente, da concentração, da temperatura e do pH, bem como do grau de contato entre o sanificante e os microrganismos, que pode ser conseguido por agitação, turbulência (uso de ultra-som) e baixa tensão superficial. Vale ressaltar que os vários microrganismos apresentam resistência diferente aos sanificantes químicos (Oliveira, 2005).

A seleção de sanificantes na indústria de alimentos depende da eficácia, da segurança e dos danos gerados pelos agentes, bem como de sua ação

corrosiva ou dos efeitos na avaliação sensorial dos produtos manufaturados (Wirtanen et al., 2001).

A determinação do sanificante eficiente é freqüentemente realizada nos testes de suspensão e, ocasionalmente, por testes baseados na superfície. Os testes de suspensão têm uma variedade de benefícios. Por exemplo, eles são relativamente simples e não requerem equipamentos especializados e extensos no laboratório, além de requerer mão-de-obra barata. Dentro dos testes metodológicos é possível testar uma diversidade de variáveis, incluindo o tempo de contato, temperatura, tipos de microrganismos e superfícies de interferência. Porém, o maior problema é que eles não refletem necessariamente condições de uso (Holah et al., 1998).

Uma estratégia de prevenção da formação de biofilme é utilizar regularmente o processo de desinfecção, antes mesmo do início da formação do biofilme. Esse processo deve ser executado rapidamente, pois a fase inicial da aderência dos microrganismos e a formação do biofilme à superfície ocorrem rapidamente, levando apenas algumas horas. Contudo, para que ocorra a morte ou a remoção dos organismos do biofilme, o biocida deve penetrar no exopolissacarídeo e alcançar a célula microbiana (Meyer, 2003).

2.9.1 Sanificantes químicos

Sanificantes eficientes são requeridos nas indústrias alimentícias, onde superfícies úmidas promovem condições favoráveis para o crescimento microbiano. Os sanificantes mais usados nas indústrias de alimentos incluem agentes oxidantes, como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, ozônio e ácido peracético; agentes desnaturantes, como os produtos à base de álcool, não oxidantes e agentes que diminuem a tensão superficial, e componentes à base de enzimas (Wirtanen et al., 2001).

Os agentes oxidantes são agentes com ação rápida, que agem diretamente em reações mediadas por radicais para oxidar matéria orgânica (Chapman, 2003).

No Brasil, o hipoclorito de sódio é o sanificante mais empregado, todavia, o ácido peracético tem certas vantagens, como a de não reagir com proteínas para produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, ter baixo impacto ambiental e por ser mais efetivo contra biofilmes (Rossoni & Gaylarde, 2000).

2.9.1.1 Peróxido de hidrogênio (H_20_2)

A propriedade bactericida do peróxido de hidrogênio é reconhecida desde a sua descoberta, pelo químico francês L. J. Thenard, em 1818 (Oliveira, 2001). O peróxido de hidrogênio é considerado forte oxidante, devido à sua capacidade de produzir radicais livres que atacam componentes celulares essenciais, incluindo proteínas, lipídeos e DNA (Kitis, 2004). Além de agente oxidante ($H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$, 1,77 V), o peróxido de hidrogênio pode também ser empregado como agente redutor ($H_2O_2 + 2OH^- \rightarrow O_2 + H_2O + 2e^-$, -0,15 V) (Mattos et al., 2003).

Dependendo de sua concentração, pode ter efeito bacteriostático ou bactericida. Segundo Oliveira (2001), em 1983, Baldry constatou que o peróxido de hidrogênio é mais eficaz como esporicida do que como bactericida e que essa eficiência é dinamizada em temperaturas mais altas. A eficiência em eliminar esporos bacterianos ocorre, pois esse, diferentemente das células vegetativas, não produzem catalase, a qual age sobre o mesmo, degradando-o (Oliveira, 2001). O mecanismo envolvido na morte de bactérias vegetativas e de fungos provoca danos ao DNA (Brul & Coote, 1999).

Apesar desse sanificante ser considerado eficiente, muitos fungos e bactérias protegem-se contra ele de várias maneiras. Alguns dos muitos sistemas incluem glutationa associado com enzimas e catalase. No entanto, quando

leveduras são tratadas em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, uma variedade de sistemas adaptativos é ativada e, posteriormente, quando submetidas a altas concentrações, as células se apresentam resistentes a esse sanificante. Enquanto algumas leveduras têm a capacidade de induzir uma resposta contra o estresse oxidativo, muitas bactérias contam com a ação da catalase para degradar níveis tóxicos de peróxido de hidrogênio (Brul & Coote, 1999).

Por ser bastante versátil, o peróxido de hidrogênio é utilizado para as mais variadas finalidades. Entre as aplicações envolvidas com o uso do peróxido de hidrogênio na forma isolada, têm-se: controle de odores; oxidação de sulfeto de hidrogênio; controle da corrosão - destruição de cloro residuais e componentes reduzidos, tais como tiossulfato, sulfetos e sulfitos; redução da demanda química e bioquímica de oxigênio - oxidação de poluentes orgânicos; oxidação de componentes inorgânicos - cianetos, NOx/SOx, nitritos, hidrazinas, etc.; oxidação de componentes orgânicos - hidrólise de formaldeído, carboidratos, componentes nitrogenados, etc., destruição de fenóis, pesticidas, solventes, plastificantes, entre outros e controle de bioprocessos - desinfecção, inibição de crescimento de bactérias, etc. Na forma combinada, pode ser empregado em procedimentos de floculação e, ou, precipitação - oxidação de complexos metálicos e incremento do desempenho de floculantes inorgânicos e tratamento de bioprocessos - desinfecção, fonte de oxigênio dissolvido e outros (Mattos et al., 2003).

Dentre as desvantagens em relação ao uso desse sanificante podem-se destacar: apresenta poder corrosivo sobre o cobre, zinco e bronze, necessita de longo tempo de contato para temperaturas baixas, demanda precauções no manuseio e dosagem e controle do oxigênio ativo na utilização. Em contrapartida, tem baixa toxicidade e efeito residual, e não requer enxágüe (Resende, 2005).

2.9.1.2 Ácido peracético

O peróxido do ácido acético, chamado de ácido peroxiacético ou peracético, é produzido pela reação do ácido acético ou anidrido acético com peróxido de hidrogênio na presença de ácido sulfúrico, que tem a função de catalisador. No entanto, um agente estabilizador, ou um seqüestrante, é adicionado durante a produção do produto (Kitis, 2004). É um composto instável, que sofre perda de 1% a 2% dos ingredientes ativos por mês, na solução a 40% e mais da metade em 6 dias, na solução 1% (Nascimento et al., 2003).

A potente atividade antimicrobiana do ácido peracético (PAA) a baixas temperaturas, juntamente com a ausência de resíduos tóxicos, tem conduzido a grande utilização na indústria de processamento de alimentos e bebidas, incluindo indústrias de processamento de carnes, enlatados, laticínios, vinhos e cerveja, além de ser amplamente aplicado nas indústrias médica, farmacêutica, têxtil, de polpa e de papel (Kitis, 2004).

O PAA apresenta várias vantagens como desinfetante, como facilidade de implementação de tratamento; largo espectro de atividade, mesmo na presença de matéria orgânica heterogênea; ausência de residual ou subprodutos tóxicos e, ou, mutagênicos; desnecessária descloração; baixa dependência do pH; curto tempo de contato; baixo impacto ambiental e tem sido o mais ativo contra os biofilmes (Souza & Daniel, 2005). Por outro lado, as maiores desvantagens associadas ao uso desse desinfetante são o aumento de conteúdo orgânico em efluentes; a grande capacidade de um recrescimento microbiano devido à presença de acido acético e a baixa eficiência contra alguns vírus e parasitas, tais como *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* (Kitis, 2004).

O provável mecanismo de ação desse sanificante pode estar relacionado com a desnaturação de proteínas e enzimas e o aumento da permeabilidade celular pela ruptura das ligações dissulfeto e sulfidrilas (McDonnell & Russel, 1999).

Rossoni & Gaylarde (2000) realizaram estudo comparando a eficiência antimicrobiana do hipoclorito de sódio e do ácido peracético sobre biofilme formado por *E. coli*, *P. fluorescens* e *S. aureus*, em superfície de aço inoxidável. *Escherichia coli*, seguida de *P. fluorescens* e *S. aureus*, apresentou maior aderência à superfície. Nas concentrações utilizadas neste estudo, o hipoclorito de sódio apresentou maior eficiência na remoção do biofilme, quando comparado com o ácido peracético. Depois que células aderidas foram tratadas com hipoclorito na concentração de 100 mg/L e 200 mg/L, o número médio delas foi reduzido de 13,7 x 10^3, 6,0 x 10^3 e 3,2 x 10^3cél/mm^2 para 1,2 x 10^2cél/mm^2 para *E. coli* e menos desse valor para as demais espécies. Em contraste, depois de tratadas com 250 mg/L de ácido peracético, o número médio de células aderidas foi reduzido para 1,2 x 10^3, 4,6 x 10^2 e 1,5 x 10^3 cél/mm^2 para *E. coli*, *P. fluorescens* e *S. aureus*, respectivamente. Na concentração de 1.000 mg/L de ácido peracético, a redução foi de 6,9 x 10^2, 1,2 x 10^2 e 1,7 x 10^2 cél/mm^2, respectivamente. Segundo os autores, tal resultado não foi satisfatório, uma vez que o ácido peracético é mais eficiente na remoção de biofilmes.

2.9.1.3 Dicloroisocianurato de sódio

O cloro foi descoberto, em 1808, por Sir Humprey Davy e teve as suas propriedades bactericidas demonstradas, sob condições de laboratório, pelo bacteriologista Koch, em 1881. Mas, somente em 1886, o seu uso como desinfetante foi aprovado pela *American Public Health Association* (APHA) (Macêdo, 2004).

A partir do início do século XIX, algumas regiões dos Estados Unidos já utilizavam este agente químico no processo de desinfecção de águas para abastecimento público. Mas, o uso contínuo do cloro só ocorreu a partir de 1902, na Bélgica, com o chamado refinamento da cloração, isto é, a determinação das

formas de cloro combinado e livre e a cloração baseada em controles bacteriológicos (Macêdo, 2004).

Na década de 1970, surgiram os chamados derivados clorados orgânicos, denominados de "cloraminas orgânicas", destacando-se o dicloroisocianurato de sódio, o ácido tricloro isocianúrico e seus sais de sódio e potássio. Estes são produtos de reações do ácido hipocloroso com aminas, iminas, amidas e imidas (Macêdo & Barra, 2007).

O dicloroisocianurato de sódio é conhecido pelos nomes de 1,3-dicloro-1,3,5-triazina-6-oxo-2,4-diona, dicloro-*s*-triazinetriona de sódio, sal de sódio 1,3,5-triazina-2,4,6-(*1H,3H,5H*)-triona e trocloseno sódico (Cunha et al., 2006).

O uso de derivados clorados de origem inorgânica, como gás cloro, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e dos derivados clorados de origem orgânica, cujo principal representante é o dicloroisocianurato de sódio, tem se expandido nos laticínios, devido à eficiência no processo de desinfecção de água, equipamentos/utensílios, embalagens, ambientes, etc., bem como em função da praticidade no manuseio, medição, transporte e armazenamento, maior solubilidade, maior período de validade, dosagem mais precisa, menor risco químico (corrosividade), modernidade do produto e a não formação de subprodutos (Cunha et al., 2006; Macedo & Barra, 2007).

Considera-se, geralmente, que a ação letal sobre os microrganismos seja devido à oxidação de proteínas celulares ou de sistemas enzimáticos pelo ácido hipocloroso não ionizado, causando hidrólise das cadeias peptídicas das membranas celulares microbianas (Veiga, 2003). Em contrapartida, os compostos clorados têm sua ação limitada em pH acima de 9 e temperaturas acima de 45 ºC e, ainda, sua ação pode ser comprometida na presença de matéria orgânica, luz solar e alguns metais (Ferreira & Astolfi-Ferreira, 2006).

Segundo Cunha et al. (2006), as *N*-cloroaminas possuem ainda maior estabilidade em solução aquosa, liberando lentamente o ácido hipocloroso e,

conseqüentemente, permanecendo efetivas por períodos longos, mesmo na presença de matéria orgânica. A formação deste agente bactericida, ácido hipocloroso, pode ser observada na Figura 4, na qual é mostrada a reação de hidrólise do dicloroisocianurato de sódio.

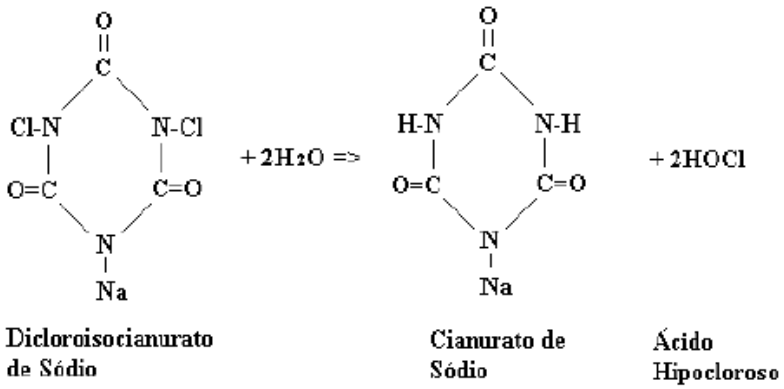

FIGURA 4 Reação de liberação de cianurato de sódio e ácido hipocloroso em meio aquoso.

Segundo Angelis & Neves (1998), os estudos não consideram o dicloroisocianurato de sódio genotóxico, mutagênico ou teratogênico. O produto pode ser irritante à pele e aos olhos. Porém, como o mesmo é apresentado em comprimidos, a possibilidade de reações adversas é minimizada. A dose letal, (DL) 50, para o homem é de 3,57 g/kg, equivalente a 214 g, para um adulto de 60 kg ou a 17,85 g, para uma criança de 5 kg. Como o maior tamanho disponível do produto é de 8,68 g em dicloroisocianurato de sódio, há grande margem de segurança, associada, ainda, à dificuldade da ingestão dos comprimidos, seja pelo sabor desagradável, como também pela sua efervescência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

3.1 Microrganismos padrões

As bactérias utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. As culturas estoque foram mantidas sob congelamento, em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL).

3.2 Obtenção do inóculo

Para a reativação das cepas, foram inoculados 10 µL de cada cultura em tubos contendo 3 mL de caldo TSB (*Tryptone Soya Broth*) e incubados, por 24 horas, a 28 ºC. Após a incubação, foram retirados 10 µL dos inóculos e transferidos para 200 mL de caldo TSB. O número de células por mL, de cada cultura, foi quantificado utilizando-se curva padrão. As culturas bacterianas foram padronizadas para cerca de 10^5 UFC/mL, A_{600nm} = 0,37 para *P. aeruginosa* e A_{600nm} = 0,087 para *P. fluorescens*.

3.3 Higienização dos cupons

A adesão bacteriana foi realizada em cupons de aço inoxidável AISI 304 com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm.

Os cupons foram limpos individualmente com acetona 100%, lavados por imersão em detergente neutro 3% durante 1 hora, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, os cupons foram novamente lavados com água destilada estéril, secos por 2 horas, em estufa, a 60 ºC e autoclavados, a 121 ºC/15 minutos (Rossoni & Gaylarde, 2000).

3.4 Adesão das células bacterianas

Em duas placas de Petri de 140 mm de dimensão, contendo aproximadamente 20 cupons de aço inoxidável, foram imersos 60 mL de leite desnatado reconstituído e inoculados 10^5 UFC/mL de cada cultura. *Pseudomonas fluorescens* foi incubada a 4 ºC e a 7 ºC e *P. aeruginosa* a 7 ºC e 28 ºC, sob agitação branda (50 rpm). Foi retirado 1 mL do leite, em seguida realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL foram tomadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 28 ºC por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expresso em UFC/mL.

Em intervalos de 48 horas, os cupons foram removidos, lavados com água peptonada e imersos em leite desnatado reconstituído estéril adicionado na placa. Esse procedimento foi realizado por cinco vezes, visando à formação completa do biofilme após 10 dias de incubação (Joseph et al., 2001 com adaptações).

Todo o experimento foi realizado em três repetições e as análises em triplicata.

3.5 Enumeração das células aderidas

Para enumerar as células aderidas, a cada dois dias de incubação foi retirado um cupom de cada placa de Petri. Estes foram lavados com água peptonada, para a eliminação de células não aderidas e o biofilme foi removido utilizando-se *swab* padronizado esterilizado. Os *swabs* foram transferidos para tubos contendo água peptonada 0,1% (v/v), sendo, em seguida, agitados em vórtex, por 2 minutos. Após esse procedimento, promoveu-se diluição seriada, alíquotas de 0,1 mL foram tomadas e o número de células viáveis determinadas em TSA (Ágar tripticase de soja), empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas, a 28 ºC, por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em UFC/cm^2 (Joseph et al., 2001 com adaptações).

3.6 Sanificação

No teste de sensibilidade das células aderidas, foram utilizados os seguintes sanificantes: peróxido de hidrogênio (5%), dicloroisocianurato de sódio (200 ppm) e ácido peracético (0,2%).

A cada dois dias, três cupons eram retirados de cada placa de Petri e submetidos ao processo de sanificação, avaliando-se, assim, a influência do tempo de incubação sobre a eficiência dos sanificantes.

3.6.1 Peróxido de hidrogênio 5%

Antes de cada procedimento de sanificação, foi aferido o pH da solução de peróxido de hidrogênio (pH 3,25) e calculada a quantidade, em %, de peróxido residual livre (PRL), utilizando-se o RQflex Plus (Merck). A partir do produto comercial, foram preparadas soluções diluídas contendo 5% de PRL.

Foi retirado um cupom de cada placa de Petri, imerso em tubo contendo 30 mL da solução e movimentado suavemente para melhor contato do agente

químico com o biofilme, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Os cupons foram enxaguados em água peptonada 0,1% (v/v). Na superfície do cupom, onde foi formada a adesão ou o biofilme, realizou-se a técnica do esfregaço com s*wabs* estéreis, sendo, em seguida, submetido à agitação em vórtex, por 2 minutos, em água peptonada 0,1% (p/v). Após esse procedimento, promoveu-se diluição seriada e, em seguida, alíquotas de 0,1 mL foram tomadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 28 ºC, por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em UFC/cm^2.

3.6.2 Dicloroisocianurato de sódio 200 mg/L

Antes do procedimento de sanificação, o pH (7,4) e a concentração, expressa em % de cloro residual total (CRT) do produto comercial (Purificador Hidrosan Plus), foram determinados usando-se colorímetro RQflex (Merck). A partir do produto comercial foram preparadas soluções diluídas contendo 200 mg/L de CRT.

Foi retirado um cupom de cada placa de Petri, imerso em tubo contendo 30 mL da solução e movimentado suavemente para melhor contato do agente químico com o biofilme, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Os cupons foram enxaguados em água peptonada 0,1% (v/v). Na superfície do cupom, em que foi formada a adesão ou o biofilme, realizou-se a técnica do esfregaço com s*wabs* estéreis, sendo, em seguida, submetido à agitação em vórtex, por 2 minutos, em água peptonada 0,1% (p/v). Após esse procedimento, promoveu-se a diluição seriada e, em seguida, alíquotas de 0,1 mL foram tomadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas, a 28 ºC, por,

aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expresso em UFC/cm^2.

3.6.3 Ácido peracético 0,2%

A partir do produto comercial foi preparada solução de ácido peracético 0,2% e aferido o pH (3,12).

Foi retirado um cupom de cada placa de Petri, imerso em tubo contendo 30 mL da solução e movimentado suavemente para melhor contato do agente químico com o biofilme, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Os cupons foram enxaguados em água peptonada 0,1% (v/v). Na superfície do cupom em que foi formada a adesão ou o biofilme, realizou-se a técnica do esfregaço com s*wabs* estéreis, sendo, em seguida, submetido à agitação em vórtex, por 2 minutos, em água peptonada 0,1% (p/v). Após esse procedimento, promoveu-se diluição seriada e, em seguida, alíquotas de 0,1 mL foram tomadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas, a 28 ºC, por aproximadamente 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expresso em UFC/cm^2.

3.7 Análise dos cupons por microscopia eletrônica de varredura

Os cupons contendo biofilme e os sanificados com peróxido de hidrogênio 5%, dicloroisocianurato de sódio 200 mg/L e ácido peracético 0,2%, um de cada cultura bacteriana, foram imersos em solução fixadora (Kornovsky modificado), pH 7,2, pelo período de 48 horas. Após este período, os cupons foram lavados com tampão cacolitato por três vezes de 10 minutos, a fim de retirar os resíduos de glutaraldeído que podem reduzir o tetróxido de ósmio e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em água, por 1 hora. Após este período, lavou-se por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratou-se em

gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030) para completar a secagem, montado em *stubs* e coberto com ouro (metalizador Bal-Tec SCD 050). No final desse procedimento, foram obtidas eletromicrografias dos microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável, antes e após o uso de sanificantes, usando-se microscópio eletrônico de varredura EVO 040 Leo.

3.8 Análise estatística

Para *Pseudomonas aeruginosa*, o experimento foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, segundo uma parcela subdividida no tempo (5 dias de análise), com tratamentos em arranjo fatorial 2x5 na parcela (2 temperaturas e 5 condições, sendo 3 sanificantes, 1 controle e 1 substrato). O valor da variável resposta foi transformado por *log (x+1)*, para atender à pressuposição de normalidade. O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijkl} = \mu + t_i + s_j + ts_{ij} + e_{ij} + d_k + dt_{ik} + ds_{jk} + dts_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

em que:

y_{ijkl} é o valor da variável dependente na l-ésima repetição que recebeu a i-ésima temperatura, j-ésima condição, no k-ésimo dia de análise, com l = 1, 2, 3;

μ é uma constante inerente a cada observação;

t_i é o efeito da i-ésima temperatura, com i = 1, 2;

s_j é o efeito do j-ésima condição, com j = 1, ..., 5;

ts_{ij} é o efeito da interação entre a i-ésima temperatura com o j-ésima condição;

e_{ij} é o erro experimental associado à parcela, identica e normalmente distribuído com média zero e variância σ_a^2;

d_k é o efeito do k-ésimo dia de análise, com k = 1, ..., 5;

dt_{ik} é o efeito da interação do k-ésimo dia de análise com a i-ésima temperatura;

ds_{jk} é o efeito da interação do k-ésimo dia de análise com o j-ésima condição;

dts_{ijk} é o efeito da interação do k-ésimo dia de análise com a i-ésima temperatura e j-ésima condição;

ε_{ijkl} é o erro experimental associado à subparcela, identica e normalmente distribuído com média zero e variância σ_b^2;

Para *Pseudomonas fluorescens*, o experimento foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições segundo uma parcela subdividida no tempo (5 dias de análise), tendo como tratamento de parcela 5 condições, sendo 3 sanificantes, 1 controle e 1 substrato. O valor da variável resposta foi transformado por *log (x+1)*, para atender à pressuposição de normalidade. O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \mu + t_i + e_{ik} + d_j + dt_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésima condição, no j-ésimo dia de análise, com k = 1, 2;

μ é uma constante inerente a cada observação;

t_i é o efeito do i-ésima condição, com i = 1, 2, 3, 4, 5;

e_{ik} é o erro experimental associado à parcela, identica e normalmente distribuído com média zero e variância σ_a^2 ;

d_j é o efeito do j-ésimo dia de análise, com k = 1, ..., 5;

dt_{ij} é o efeito da interação do j-ésimo dia de análise com o i-ésima condição;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à subparcela, identica e normalmente distribuído com média zero e variância σ_b^2

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando como substrato o leite desnatado reconstituído, houve crescimento de ambas as espécies bacterianas, exceto *Pseudomonas fluorescens*, a 4 ºC. *Pseudomonas aeruginosa* a 28 ºC apresentou ótimo crescimento (10,4 Log UFC/mL), quando comparado a 3,7 Log UFC/mL e 4,2 log UFC/mL, para *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* a 7 ºC, respectivamente (Figura 5). Quando comparado o inóculo inicial (10^5 UFC/mL), houve decréscimo no número de microrganismos no leite, exceto para *P. aeruginosa* a 28 ºC.

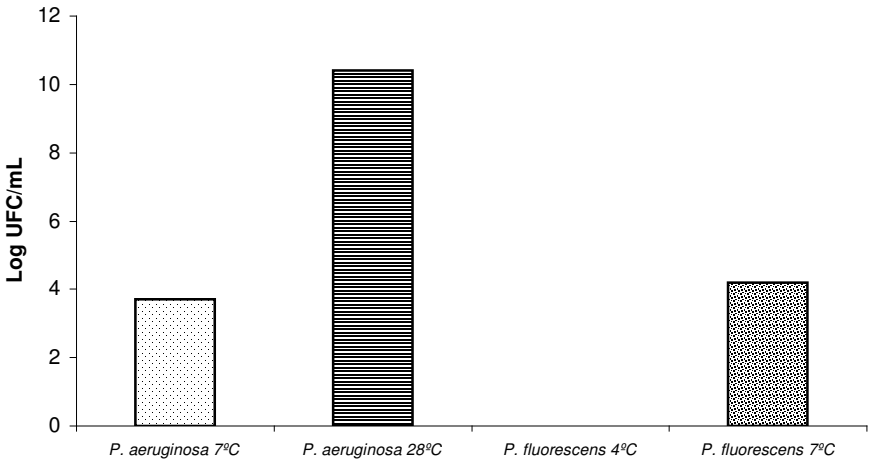

FIGURA 5 Valores médios de crescimento de *Pseudomonas* spp, transformados por *log (x + 1)*, em leite, a diferentes temperaturas, após 10 dias de incubação.

Pseudomonas aeruginosa, em ambas as temperaturas, causou alteração no leite, tornando-o amarelado e com odor desagradável. Isso se deve à produção de lípases e proteases pela bactéria (Lyon et al., 1993); por outro lado, *P. fluorescens* não apresentou tais características, possivelmente por causa do pequeno crescimento.

Crescimento, geralmente, é caracterizado pela taxa de crescimento exponencial (fase log) precedida por um período no qual a célula desenvolve certas mudanças fisiológicas para crescer (fase lag). Enquanto a taxa de crescimento depende das condições em que a célula se encontra, a fase lag é influenciada adicionalmente pela condição inicial da célula, que pode variar dependendo do substrato, do pH, da temperatura e de vários outros fatores aos quais a célula pode ter sido submetida.

Embora vários autores relatem que *P. fluorescens* se desenvolve bem a partir de 0 ºC, a cepa estudada não se adaptou bem às condições proporcionadas, 4 ºC. Vale ressaltar que a mesma foi isolada de tanques de pré-filtragem. Entretanto, novas ferramentas são necessárias para o entendimento do mecanismo pelos quais as células promovem mudanças, quando inoculadas em meios frescos.

Nas últimas décadas, genes, tais como promotores de RNA ribossomal (rRNA), que são expressos no início do ciclo do crescimento celular, ganharam relevante atenção, em particular ao promotor constitutivo *rrn* P_1 e P_2. A transcrição do rRNA é o passo limitante da taxa de síntese de ribossomos e os promotores de rRNA são cuidadosamente regulados por condições ambientais para otimizar a concentração de ribossomos na célula (McKellar, 2007).

Estudo realizado por McKellar (2007) demonstrou que a velocidade específica de *P. fluorescens* aumentou significantemente de acordo com as temperaturas estudadas, variando de 0,14 h^{-1} a 0,68 h^{-1}, quando cultivada a 10 ºC e 30 ºC, respectivamente. O mesmo autor observou decréscimo significativo no

tempo da fase lag, sendo a máxima de 2,25 horas, a 10 °C, 1,70 hora, a 15 °C e um mínimo de 0,628 horas, a 30 °C. A taxa de atividade do promotor específico aumentou significativamente de 0,976 h^{-1}, a 10 °C, 1,21 h^{-1}, a 15 °C, porém, os valores de 20 ºC e 25 °C não foram significativamente diferentes de 10 °C. O máximo valor 1,41 h^{-1} foi obtido a 22 °C. A duração da fase lag na taxa de atividade do promotor específico foi de, aproximadamente, 0,5 hora a 10 ºC e 30 °C. As demais temperaturas foram de aproximadamente 0,2 hora.

Makhzoum et al. (1995) estudaram alguns fatores que afetam o crescimento e a produção de lípases extracelulares por *P. fluorescens* linhagem 2D. Foi observado que a temperatura não afetou o crescimento, exceto a temperatura de 10 °C, em que o crescimento foi lento. Por outro lado, houve redução na produção de lípase em 35%, quando a temperatura passou de 20 °C para 25 °C e 95% quando a temperatura passou de 25 ºC para 30 °C, sendo a produção ótima de lípase a 20 °C. Os resultados mostraram que o bom crescimento e a produção ótima de lípases foram obtidos em água peptonada. No entanto, o crescimento ótimo foi observado em meio de extrato de levedura, porém, muito pouca atividade da lípase foi observada. Íons de metais, como mercúrio, cobre, zinco, manganês e cobalto, foram inibitórios para a produção de lípases. Por outro lado, o cálcio não afetou o crescimento e estimulou, em 360%, a produção de lípases. Os íons de metais exercem efeitos tóxicos de várias maneiras, por substituírem metais nativos de seus sítios de ligação normal, por ligar-se a proteínas e ácidos nucléicos, alterando sua conformação ou por afetar a permeabilidade da membrana por meio de interações com fosfolipídios.

Bactérias e outros microrganismos têm tendência natural de aderir a superfícies como mecanismo de sobrevivência, no entanto, a colonização bacteriana a superfícies sólidas tem sido descrita como estratégia básica e natural em uma variedade de ambientes (Cappello & Guglielmino, 2006). A

adesão de bactérias à superfície depende de parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e relacionados ao material. Portanto, a topografia da superfície tem sido largamente estudada, uma vez que microrganismos alocados em ranhuras ou fendas podem escapar de procedimentos de limpeza e desinfecção, e, posteriormente, podem vir a contaminar ou a recontaminar produtos alimentícios durante o processamento (Hilbert et al., 2003).

Como se pode observar na Figura 6, a superfície do aço apresenta-se bastante áspera.

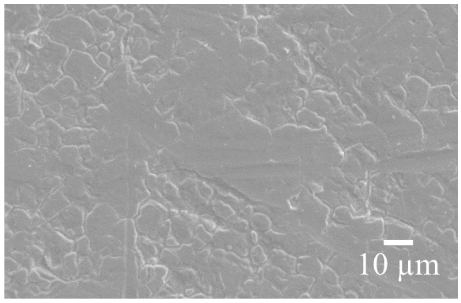

FIGURA 6 Eletromicrografia de varredura de cupom de aço inoxidável AISI 304 estéril, utilizado nesse experimento.

Geralmente, tem sido recomendada, para superfícies em contato com alimento, a aspereza de 0,8 µm ou menos (Hilbert et al., 2003). Vários estudos têm sido realizados, a fim de verificar se a adesão ocorre em menor proporção em superfícies mais lisas. No entanto, estudo realizado por Barnes et al. (1999) não demonstrou diferença significativa de adesão em superfícies com 0,4 e 0,035 µm de aspereza. Resultado similar foi observado em estudo realizado por Hilbert et al. (2003), os quais observaram que a aderência de *Pseudomonas* sp., *Listeria monocytogenes* e *Candida lipolytica* em aço inoxidável não foi afetada

pela aspereza da superfície (0,01-0,9). Os autores concluíram que superfícies refinadas não influenciam na adesão de microrganismos, colonização e remoção, mas constitui importante fator de resistência de corrosão de superfícies.

Pseudomonas aeruginosa formou biofilme em aço inoxidável, quando cultivada em leite desnatado reconstituído a 28 ºC. Contudo, essa bactéria não foi capaz de formar biofilme, quando cultivada a 7 ºC, por 10 dias, sendo encontrada a adesão de 3,9 Log UFC/cm^2 (Figura 7). Este fato deve ser considerado, segundo Andrade et al. (1998) e Ronner & Wong (1993), porém, se o valor de Wirtanen et al. (1996) for considerado, pode-se dizer que *P. aeruginosa* formou biofilme nessas condições.

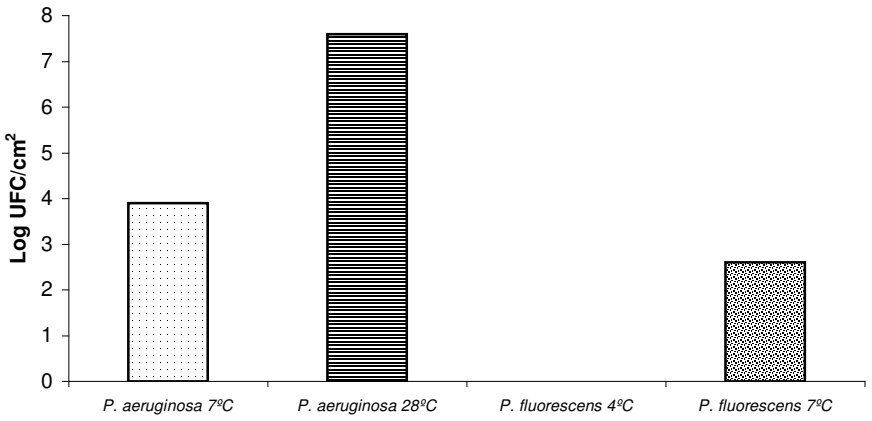

FIGURA 7 Valores médios da adesão e formação de biofilme por *Pseudomonas* spp transformados por *log (x + 1)*, a diferentes temperaturas.

Essa bactéria é considerada mesofílica, com crescimento ótimo a 28 ºC. Em experimento anterior mostrou-se que não houve crescimento da bactéria a 7 ºC. Possivelmente, as UFC/mL enumeradas a partir do leite foram aquelas

sobreviventes, entretanto, se o microrganismo não encontra vantagens ambientais para seu crescimento, ele não forma biofilme.

Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre o tempo de cultivo, para ambas as temperaturas estudadas de *P. aeruginosa*, dado pelo teste F da análise de variância, a 5% de probabilidade (Anexo 3). Entretanto, nas Figuras 8 e 9, observa-se que houve diferença entre o tempo de cultivo e as temperaturas estudadas de *P. aeruginosa*. Segundo Kumar & Anand (1998), microscopia eletrônica de varredura tem sido bastante utilizada para estudos de biofilme, em especial microscopia eletrônica de varredura ambiental (ESEM), uma vez que tal técnica permite visualizar as amostras sem a necessidade de procedimentos da microscopia convencional. Esse método tem, ainda, capacidade de preservar algumas das estruturas associadas com amostras biológicas que permanecem em seu estado hidratado e viável.

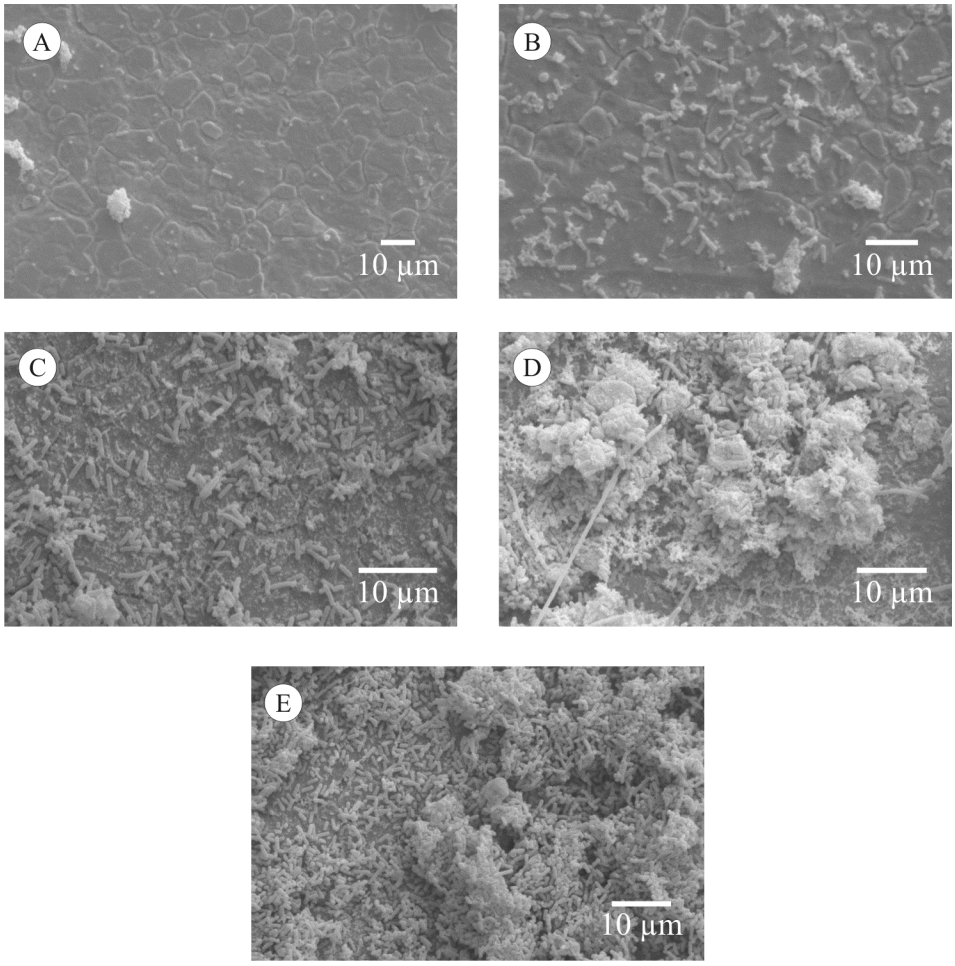

FIGURA 8 Eletromicrografia eletrônica de varredura da formação de biofilme por *P. aeruginosa*, quando cultivada em leite desnatado reconstituído a 28 ºC, em aço inoxidável com 2 dias (A), 4 dias (B), 6 dias (C), 8 dias (D) e 10 dias (E) de incubação.

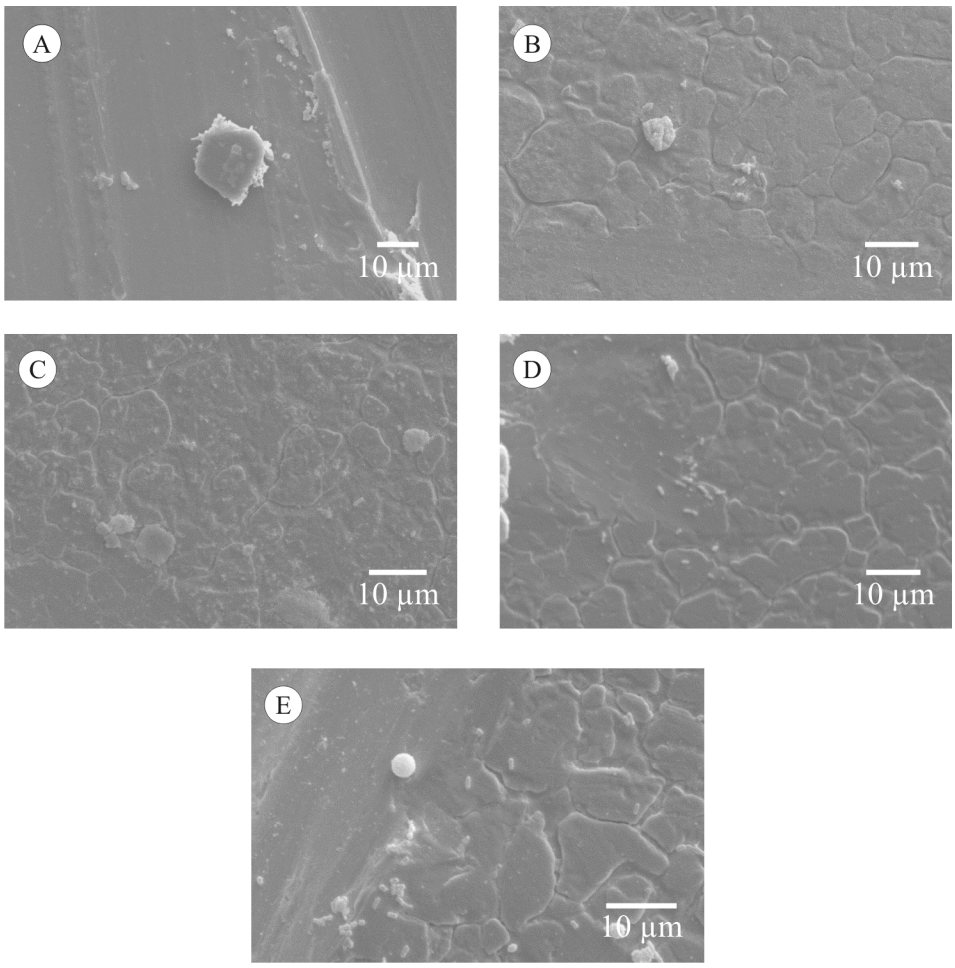

FIGURA 9 Eletromicrografia eletrônica de varredura da adesão de *P. aeruginosa*, quando cultivada em leite desnatado reconstituído a 7 ºC, em aço inoxidável com 2 dias (A), 4 dias (B), 6 dias (C), 8 dias (D) e 10 dias (E) de incubação.

Considerando que a concentração de células aderidas por cm^2 deve ser de 10^5 (Ronner & Wong, 1993), *P. fluorescens* também não formou biofilme, quando cultivada a 7 ºC, uma vez que o número obtido foi de 2,6 Log UFC/cm^2. Novamente, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) durante o tempo de cultivo (Anexo 4). No entanto, análise baseada em micrografia eletrônica de varredura mostra que houve grande aderência de células no 10º dia de incubação (Figura 10).

Oulahal et al. (2008) analisaram a capacidade de aderência de *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável, utilizando, como substrato, leite desnatado pasteurizado, leite cru e coalho de queijo, incubados a 12 ºC e 25 ºC, durante 8 dias. *Listeria innocua* aderida ao aço inoxidável inerte em presença de coalho de queijo alcançou, aproximadamente, 3,6±0,2 Log UFC/cm^2, a 12 ºC, mas não foi detectada a 25 ºC, depois de 8 dias. Maior contagem foi obtida com leite cru, a 12 ºC em aço inoxidável (8,6±0,7 Log UFC/cm^2). Com leite desnatado pasteurizado, depois de 8 dias de incubação, a contagem foi de 9,4±0,7 Log UFC/cm^2 a 12 ºC e 3,9±0,5 Log UFC/cm^2 a 25 ºC, em aço inoxidável. O crescimento de *S. aureus* foi limitado no coalho de queijo quando comparado com *L. innocua* as temperaturas testadas. Em coalho de queijo não foi detectado crescimento de *S. aureus* em aço inoxidável, porém, a 25 ºC, houve a aderência de 0,8±0,3 Log UFC/cm^2 da bactéria. Quando utilizado o leite desnatado pasteurizado, não houve crescimento na superfície de aço inoxidável de *S. aureus* com 8 dias de incubação a 25 ºC, em contrapartida, a 12 ºC, a contagem alcançou 7,8±0,2 Log UFC/cm^2. Com leite cru, não houve diferença na contagem de *S. aureus*, a 12 °C e 25 ºC em aço inoxidável.

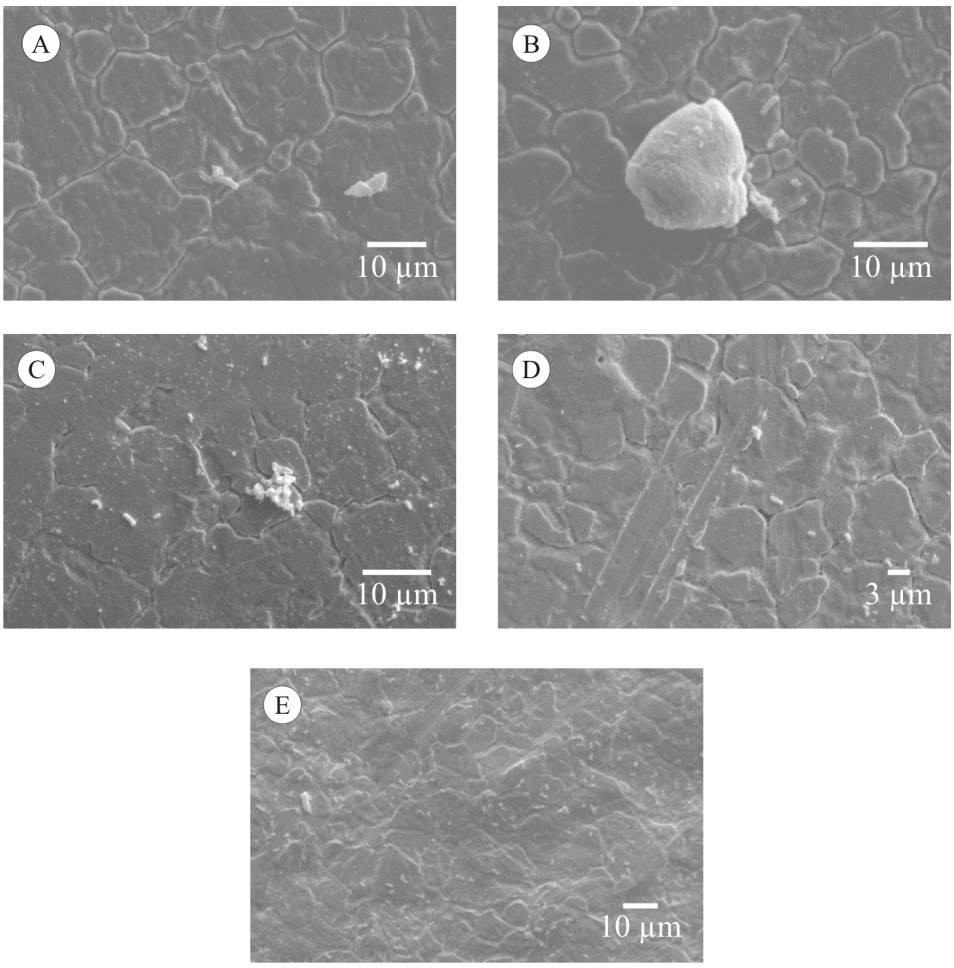

FIGURA 10 Eletromicrografia eletrônica de varredura da adesão de *P. fluorescens* quando cultivada em leite desnatado reconstituído a 7 ºC em aço inoxidável com 2 dias (A), 4 dias (B), 6 dias (C), 8 dias (D) e 10 dias (E) de incubação.

Segundo Song & Leff (2006), fatores ambientais, como concentração eletrolítica e composição do meio, têm importante impacto na formação do biofilme. Interações eletrostáticas contribuem para coesão do biofilme e cátions são *cross linkers* significantes da matriz do biofilme, pois contribuem para integridade e estabilidade da membrana externa da bactéria e propriedades de lipopolissacarídeos. Cátions bivalentes, como Mg^{2+} e Ca^{2+}, podem influenciar diretamente na formação do biofilme por meio de seus efeitos na interação eletrostática e, indiretamente, no processo de aderência dependente da fisiologia, por agir como importantes cátions celulares e cofatores enzimáticos. Estudo realizados por tais autores, utilizando diferentes concentrações de Mg^{2+} (0; 0,1 e 1,0 mM $MgCl_2$), revelaram que, para *P. fluorescens,* o Mg^{2+} não influenciou no crescimento de células planctônicas, mas, durante a formação do biofilme, o Mg^{2+} aumentou a abundância de células aderidas e a subseqüente formação e estrutura do biofilme.

A resiliência física do biofilme é resultante de interações múltiplas entre componentes da matriz (exopolissacarídeos), apêndices da superfície celular (fímbria, flagelo e fatores de agregação) e lipopolissacarídeos. No caso de biofilme produzido por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis mutantes *rdar* e, ainda, por *Pseudomonas fluorescens* SBW25, a expressão de uma matriz de celulose e o fator de aderência (fimbria) são os principais componentes que contribuem para a formação e integridade do biofilme (Spiers & Rainey, 2005).

Entre as vantagens de formar biofilme estão a capacidade da matriz polimérica de capturar e concentrar grande número de nutrientes ambientais, como carbono, nitrogênio e fosfato; a capacidade de resistir a estratégias de remoção, tais como agentes microbianos, liberação de fagócitos do hospedeiro e radicais de oxigênio e defesas de proteases, além de poder dispersar pela

desadesão, sendo que as microcolônias podem desprender sobre direção do fluido mecânico ou por meio de uma resposta genética (Shirtliff et al., 2002).

Campos elétricos, superfícies modificadas catalisadoras e ultra-som têm sido utilizados para aumentar a remoção e a eficácia dos biocidas contra os biofilmes, porém, esses sistemas são limitados a pequenas áreas e não têm sido encontrada uma maneira de aplicar na prática. Algumas enzimas também têm sido utilizadas como sinergistas para aumentar a eficácia dos desinfetantes, principalmente enzimas hidrolisantes de proteases e polissacarídeos (Meyer, 2003). Estudo realizado por Jessen & Lammert (2003) investigou vários métodos, tais como tratamento mecânico e desinfecção extra para a remoção de biofilme por *L. monocytogenes.*

As Figuras 11, 12, 13 e 14 mostram o efeito dos sanificantes dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético sobre as células de *P. aeruginosa* aderidas em aço inoxidável, sob a temperatura de 7 °C e 28 ºC. Não houve efeito significativo ($p>0,05$) na redução do número de células aderidas ou em biofilme de *P. aeruginosa* pelos sanificantes utilizados (Anexo 1). Entretanto, deve-se atentar para o fato de que as células aderidas ficaram em exposição aos agentes sanificantes por apenas 1 minuto.

Deve-se notar que vários experimentos demonstram que, mesmo sob exposição a agentes antimicrobianos acima de 10 minutos, não se consegue a erradicação de um biofilme maduro. Chambless et al. (2006) mostram que, devido à penetração vagarosa do agente antimicrobiano, o biofilme possui boa proteção até 15 horas de exposição ao antimicrobiano, sendo necessárias cerca de 50 horas de exposição para que o biofilme seja erradicado. Assim, o pequeno tempo de exposição do biofilme ao sanificante pode mostrar a alta eficiência dos sanificantes, pois houve redução de 1,3; 1,2 e 0,9 ciclos log pelas células aderidas a 7 ºC pela exposição à solução de dicloroisocianurato de sódio, ácido peracético e peróxido de hidrogênio, respectivamente.

A atividade desinfetante do ácido peracético é baseada na liberação de oxigênio ativo. Ele rompe funções quimiosmóticas de lipoproteínas da membrana citoplasmática e o transporte por meio da deslocação ou da ruptura da parede celular. Isso pode ser igualmente efetivo contra lipoproteínas da membrana externa, facilitando a ação contra bactérias Gram-negativas. Ácido peracético intracelular pode também oxidar enzimas essenciais; assim, vias bioquímicas vitais, transporte através da membrana e níveis de solutos intracelulares são danificados, além do mais foi constatado que o PAA age na base de moléculas de DNA (Kitis, 2004).

Da mesma forma, quando o biofilme a 28 ºC de *P. aeruginosa* foi tratado pelos sanificantes, ocorreram reduções de 2,4; 1,0 e 1,6 ciclos log do número detectado de células pelas soluções de dicloroisocianurato de sódio, ácido peracético e peróxido de hidrogênio, respectivamente. Esse fato não era esperado, uma vez que *P. aeruginosa* produz catalase, possuindo a capacidade eficiente em proteger o biofilme. Além disso, mensuração da capacidade de penetração do peróxido de hidrogênio no biofilme de *P. aeruginosa* mostra que ele não consegue penetrar completamente no biofilme devido a interações de reação-difusão (Stewart et al., 2000).

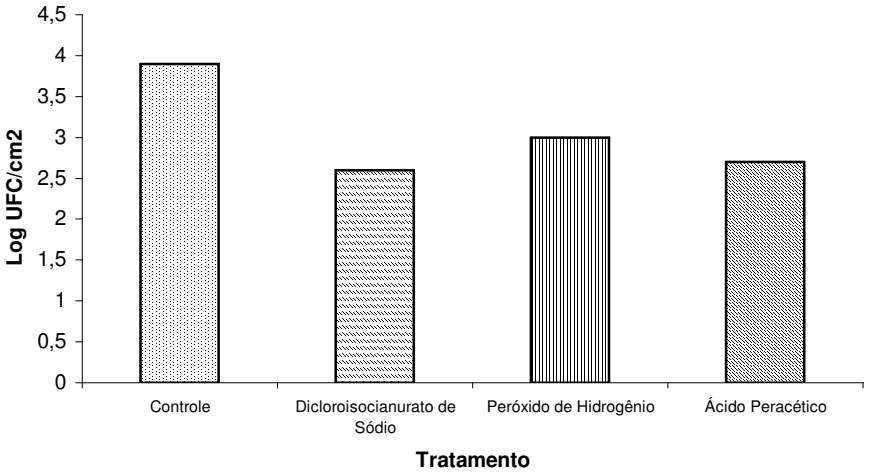

FIGURA 11 Valores médios de Log UFC/cm^2 de *P. aeruginosa*, após 10 dias de incubação em leite desnatado a 7 ºC, submetidos a tratamento de sanificantes por 1 minuto.

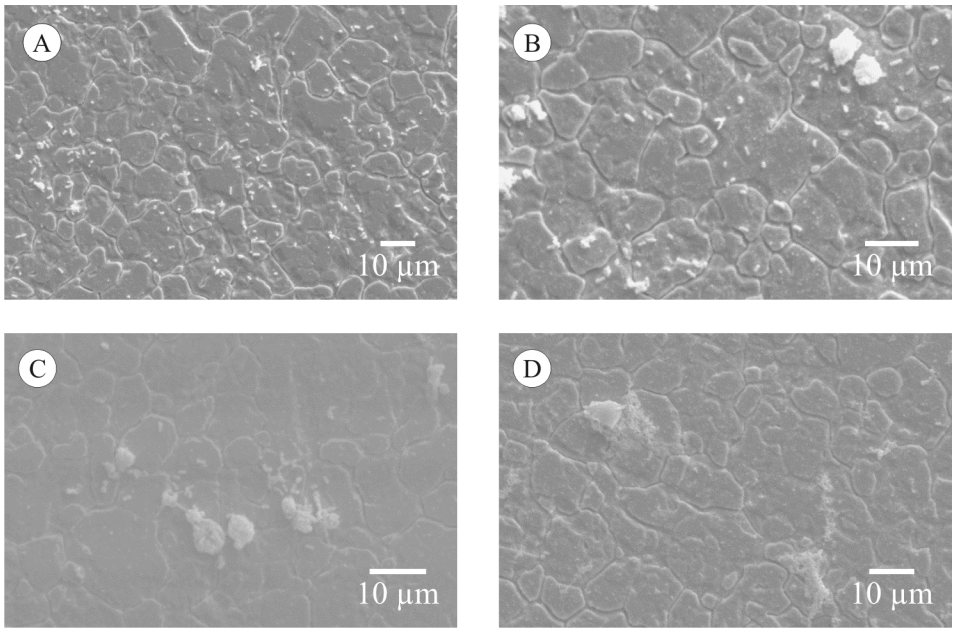

FIGURA 12 Eletromicrografia de varredura da adesão de *P. aeruginosa* em aço inoxidável (A), após incubação em solução de peróxido de hidrogênio 5% (B), ácido peracético2% (C) e dicloroisocinurato de sódio 200 mg/L (D), após 10 dias de incubação a 7 ºC, em leite desnatado.

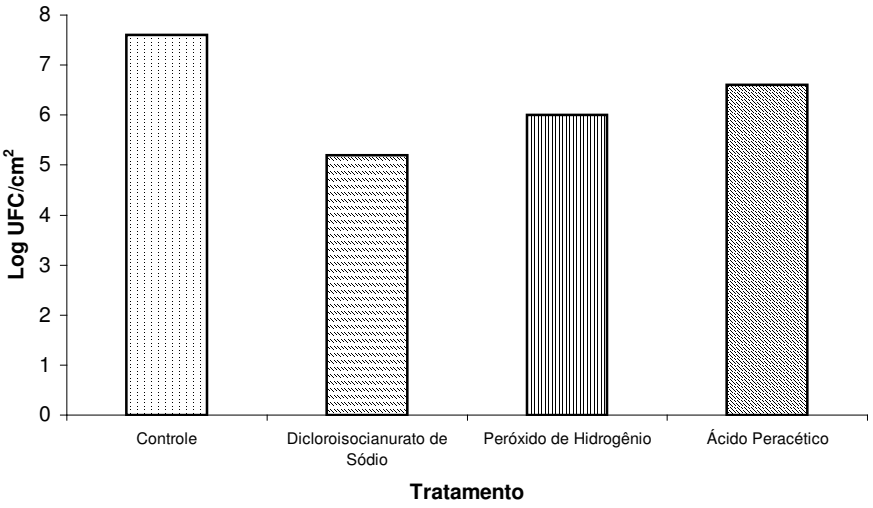

FIGURA 13 Valores médios de Log UFC/cm^2 por *P. aeruginosa* após 10 dias de incubação em leite desnatado a 28 ºC, submetidos a tratamento com sanificantes por 1 minuto.

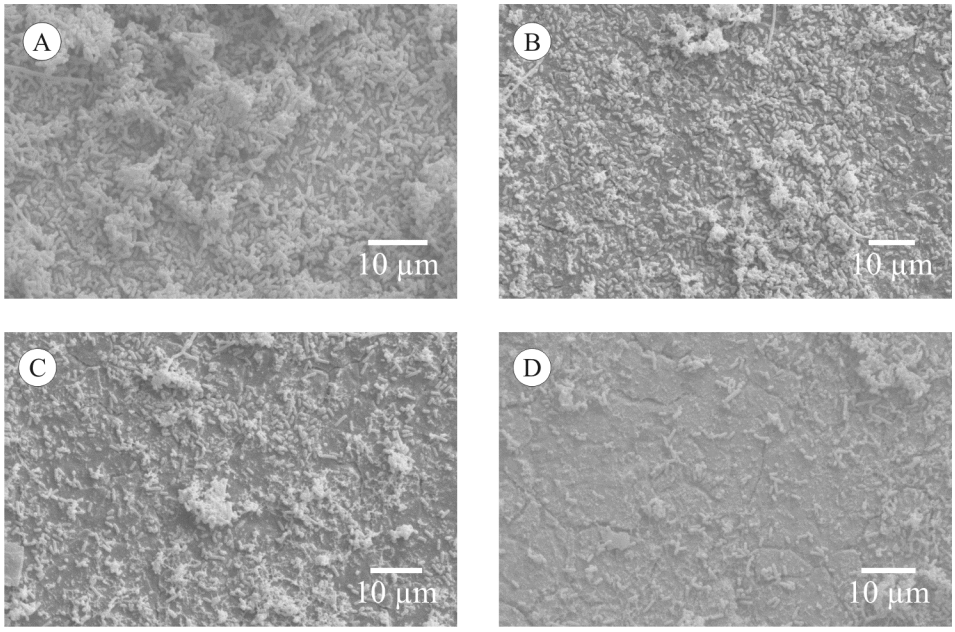

FIGURA 14 Eletromicrografia de varredura da formação de biofilme por *P. aeruginosa* em aço inoxidável (A), após imersão em solução (A) de peróxido de hidrogênio 5% (B), ácido peracético 0,2% (C) e dicloroisocinurato de sódio 200 mg/L (D), após 10 dias de incubação a 28 ºC, em leite desnatado reconstituído.

A atividade antibacteriana de compostos à base de cloro é formada quando o cloro ou os componentes de hipoclorito são adicionados à água e ácido hipocloroso é formado. O efeito de hipocloritos é baseado na penetração de químicos no interior da célula, bem como reações químicas com químico no protoplasma celular. O efeito bactericida do cloro é baseado na atividade oxidativa em sistemas de enzimas essenciais da célula (Wirtanen et al., 2001).

Células de *Salmonella weltevreden* em forma de biofilme sobre aço inoxidável sobreviveram ao tratamento com Cl_2 a 100 ppm, após exposição por 15 minutos e 50, 20 e 10 ppm após 25 minutos (Joseph et al., 2001). Como encontrado nos testes realizados com biofilme e células aderidas de *P.*

aeruginosa, nesse experimento Joseph et al. (2001) também não conseguiram redução substancial do número de Log UFC/cm^2 para *Salmonella weltevreden*. As reduções foram de 1,9; 1,43 e 0,74 Log UFC/cm^2, a 50, 20 e 10 ppm. Os mesmos autores relataram que a exposição do biofilme de *Salmonella* FCM40 ao Cl_2 a 10 ppm por 25 minutos e 20 ppm por 25 minutos reduziu a densidade populacional de 1 e 2 ciclos log, respectivamente, não sendo detectada nenhuma UFC/cm^2 nos cupons após a exposição do biofilme a 100 ppm por 20 minutos.

Norwood & Gilmour (2000) relataram que concentração de cloro ativo maior que 1000 ppm é necessária para a redução substancial do número de bactérias no biofilme, enquanto 10 ppm são suficientes para a redução de células planctônicas. Apesar disso, o cloro ativo é freqüentemente requerido como a primeira opção no combate do biofilme, isso devido ao fato de que o cloro, além de matar, os microrganismos são conhecidos também por removerem exopolissacarídeo da superfície e ainda fazem com que a aderência de novas bactérias seja dificultada (Meyer, 2003). Embora o dicloroisocianurato de sódio tenha sido mais efetivo em reduzir o número de UFC/cm^2 de *P. aeruginosa*, em detrimento do ácido peracético, nesse experimento, Fatemi & Frank (1999) relataram que ele é mais eficiente do que o cloro na morte do biofilme de *Listeria* e *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável.

Resultados obtidos por Rossoni & Gaylarde (2000) corroboram os resultados obtidos neste trabalho. Estes autores obtiveram maiores reduções no número de células aderidas em aço inoxidável de *E. coli*, *S. aureus* e *P. fluorescens*, quando utilizaram hipoclorito a 100 ou 200 ppm.

Diferentemente de *P. aeruginosa*, as células aderidas de *P. fluorescens* foram mais afetadas pelo peróxido de hidrogênio do que pelo dicloroisocianurato de sódio (Figura 15 e 16). Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os sanificantes estudados (Anexo 4), houve redução

em ciclos log de 0,4; 1,4 e 0,7 para dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético, respectivamente.

Acredita-se que, devido à alta difusão do peróxido de hidrogênio no interior da célula e por haver baixa densidade populacional, a catalase endógena não foi ativa o suficiente para produzir enzimas que protegem as células individuais (Brul & Coote, 1999).

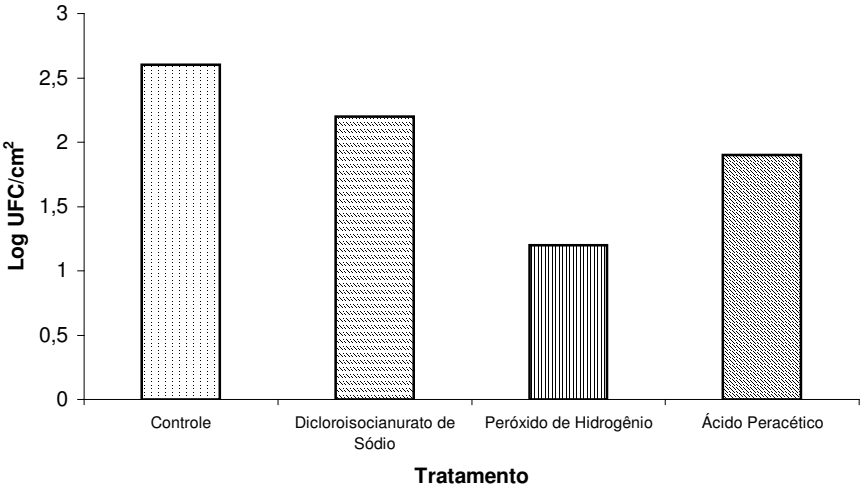

FIGURA 15 Valores médios Log UFC/cm^2 de *P. fluorescens* 7 ºC, segundo o uso de sanificantes químicos no seu controle.

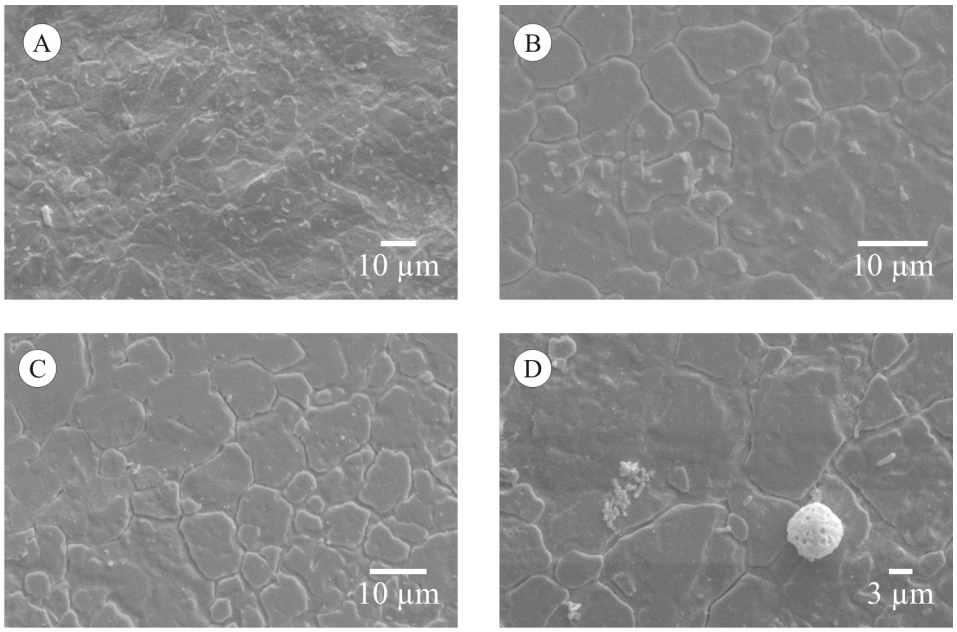

FIGURA 16 Eletromicrografia de varredura da adesão de *P. fluorescens* a 7 ºC em aço inoxidável (A), após 10 dias de incubação em leite desnatado e o uso de dicloroisocinurato de sódio 200 mg/L (B), peróxido de hidrogênio 5% (C) e ácido peracético 2% (D) no seu controle.

O efeito do peróxido de hidrogênio é baseado na produção de radicais livres que afetam os polissacarídeos e as glicoproteínas no biofilme. Wirtanen et al. (2001) mostraram que desinfetantes à base de peróxido foram efetivos permeabilizadores.

Segundo Chapman (2003), um mecanismo adicional de sobrevivência de células expostas a oxidantes é a tolerância fenotípica obtida no crescimento de células no biofilme. A proteção a oxidantes proporcionada por crescimento de células em biofilme deve-se à reatividade do oxidante com componentes do biofilme, incluindo substâncias poliméricas extracelulares e a própria célula. Assim, o oxidante é consumido antes de reagir com as células mais profundas do

biofilme, devido ao mecanismo de reação de difusão cinética; por outro lado, o mecanismo de redução na difusão não é suficiente para proteger biofilme mais finos, o que pode permitir, em tempo suficiente, que a célula induza outros mecanismos de defesa, tais como *oxyR*, que repara danos causados por radicais de oxigênio.

Recentes estudos com bactérias estressadas têm demonstrado que, depois da adesão ou depois de um estresse externo, como choque osmótico ou térmico, ou desinfecção, elas são capazes de permanecer em estado não cultivável, mas viável. Bactérias podem permanecer em seu estado de dormência, portanto, seu estado fisiológico pode ser reversível e o microrganismo patogênico pode conservar sua virulência. Bactérias dormentes não podem ser detectadas por cultivo, mas, mesmo assim, representam grande perigo (Fuster-Valls et al., 2008).

5 CONCLUSÕES

Houve a formação de biofilme em superfície de aço inoxidável apenas por *P. aeruginosa*, quando incubada a 28 ºC e adesão de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, quando incubadas a 7 ºC.

O dicloroisocianurato de sódio foi o sanificante mais eficiente na redução da adesão e biofilme por *P. aeruginosa* a 7 ºC e a 28 ºC, respectivamente. Em contrapartida, o peróxido de hidrogênio foi mais eficaz na redução da adesão de *P. fluorescens* a 7 ºC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI-ALI, A.; MOHAMMADI-MEHR, M.; ALAEI, Y. A. Bactericial activity of various antibiotics agaist biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Agents**, n. 27, p. 196-200, 2006.

ALLISON, D. G.; RUIZ, G.; SANJOSE, C.; JASPE, A.; GILBERT, P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 179-184, 1998.

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

ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 590-596, maio/jun. 2003.

ANDRADE, N. J. Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios. In: WORKSHOP SOBRE DESENVOLVIMENTO NO SETOR DE LEITE, 2., 2004, Viçosa. **Anais**...Viçosa, MG: UFV, 2004. 14 p.

ANGELIS. J. A. NEVES, V. A. P. L. Desinfecção de águas com substâncias à base de dicloroisocianurato de sódio. In: CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 26., 1998, Lima. **Proceedings**… Lima, Perú**:** Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 1998. 12 p.

AOI, Y. *In situ* identification of microorganisms in biofilm communities. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 552-556, 2002.

BARNES, L. M.; LO, M. F.; ADAMS, M. R.; CHAMBERLAIN, H. L. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4543-4548, 1999.

BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20-26, Jan. 2005.

BROWER, C. K.; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 152-157, May 1996.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

CAPPELLO, S.; GUGLIELMINO, S. P. P. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 37, p. 205-207, 2006.

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

CARDOSO, R. C. V. **Eficiência de agentes sanificantes na redução da microbiota das mãos de manipuladores de alimentos**. 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CASTRO, C. S. B.; SALES, L. S.; GONZALEZ. B. M. Envelhecimento em um aço inoxidável AISI 304 contendo martensita induzida por deformação. **Rem: Revista Escola de Minas,** v. 60, n. 1, p. 111-115, jan./mar. 2007.

CHAMBLESS, J. D.; HURD, S. M.; STEWART, P. S. A three dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobios. **Application Enviroment Microbiology**, v. 72. n. 3, p. 2005-2013, 2006.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration e Biodegradation**, n. 51, p, 271-276, 2003.

CHEN, M. J.; ZHANG, Z.; BOTT, T. R. Effects of operating conditions on the adhesive strength of *Pseudomonas fluorescens* biofilms in tubes. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**. n. 43, p. 61-71, 2005.

CLOETE, T. E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration e Biodegradation**, n. 51, p. 277-282, 2003.

COSTA, E. T. R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. 1999. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

COSTERTON, W. J.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Cambridge University Press**, v. 1, p. 1-4, 2004.

CRIADO, M. T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**. v. 48, n. 2, p. 123-126, 1994.

CUNHA, A. C.; PAIXÃO, F, M.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F. Cloreto isocianúrico e cloreto cianúrico: aspectos gerais e aplicações em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 520-527, 2006.

DEETH, H. C.; TOUCH, V. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 55, n. 3, p. 153-168, Oct. 2000.

DUNNE JÚNIOR, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms latety? **Clinical Microbiology**, Whashington, v. 15, n. 2, p. 155-166, Apr. 2002.

FATEMI, P.; FRANK, J. F. Inactivation of *Listeria monocytogenes/Pseudomonas* biofilms, by peracid sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 761-795, 1999.

FERREIRA, A. P.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7., 2006, Chapecó. **Anais**... Chapecó, SC: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários, Brasil, 2006.

FERREIRA, L. L. **Estrutura clonal e multirresistência em** *Pseudomonas aeruginosa.* Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2005. (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária).

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. 2000. 76 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FREITAS, L. H. **Sistema especialista para diagnóstico de toxinfecções alimentares de origem bacteriana**. 1995. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FUSTER-VALLS, N.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, n. 19, p. 308-314, 2008.

GIBSON, H. J.; TAYLOR, H.; HALL, K. E.; HOLAH, J. T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 41-48, 1999.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, Canada, n. 7, p. 981-994, 2005.

HAUBLER, S. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 546-551, 2004.

HILBERT, L. R.; BAGGE-RAVN, D.; KOLD, J.; GRAM, L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration e Biodegradation**, n. 52, p. 173-185, 2003.

HOLAH, J. T.; LAVAUD, A.; PETERS, W.; DYE, K. A. Future techniques for disinfectant efficacy testing. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 41, p. 273-279, 1998.

HU, J. Y.; YU, B.; FENG, Y. Y; TAN, X. L.; ONG, S. L.; NG, W. J.; HOE, W. C. Investigation into biofilms in a local drinking water distribution system. **Biofilms**, v. 2, p. 19-25, 2005.

ISMAIL, Kh. M.; JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K.; EARTHMAN, J. C. The influence of bacteria on the passive film stability of 304 stainless steel. **Electrochimica Acta,** v. 44, p. 4685-4692, 1999.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **Fems Microbiology**, n. 236, p. 163-173, 2004.

JESSEN B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration e Biodegradation**, n. 51, p. 265-269, 2003.

JOSEPH, B.; OTTAS, S. K.; KARUNASAGAR, I; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 64, n. 3, p. 367-372, mar. 2001.

KEEVIL, C. W.; WALKER, J. T. Normarski DIC microscopy and image analysis of biofilms. **BINARY**, v. 4, p. 93-95, 1992.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, Oxford, v. 30, n.1, p. 47-55, Mar. 2004.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated-EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, p. 123-127, 2006.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.

KYAW, C. M. **Biofilmes microbianos**. Disponível em: <http://www.unb.br/.../biofilme/biofilme.html>. Acesso em: 04 mar. 2008.

LASA,I.; PENADÉS, J. R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99-107, 2006.

LASPIDOU, C. S.; RITTMANN, B. E. Modelling biofilm complexity by including active and inert biomass and extracellular polymeric substances. **Biofilms**, v. 1, p. 285-291, 2004.

LAWRENCE, J. R.; KORBER, D. R.; HOYLE, B. D.; COSTERTON, J. W.; CALDWELL, D. E. Optical sectioning of microbial biofilms. **Bacterial**, v. 173, p. 6558-6567, 1991.

LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R. "Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms". **Methods Enzymol**, v. 310, p. 131-144, 1999.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJUMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **RAPP**. v. 9, p. 41, 2001.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturale *Salmonella typhymurium* in single and binary biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1186-1191, 1995.

LYON, W. J.; SETHI, J. K.; GLATZ, B. A. Inhibition of psychrotrophic organisms by propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*.. **Journal Dairy Science**, v. 76, p. 1506-1513, 1993.

MACÊDO, J. A. B. O processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados em função do pH e a portaria 518/2004 do Ministério da Saúde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2004, Fortaleza. **Anais**... Fortaleza: Associação Brasileira de Química, 2004.

MACÊDO, J. A. B.; BARRA, M. M. **"Derivados clorados de origem orgânica uma solução para o processo de desinfecção de laticínios e para desinfecção de água potável"**. Disponível em: <http://www.aguaseaguas.ufjf.br>. Acesso em: 20 mar. 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 986 p.

MAH, T-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology,** v. 9, n. 2, p. 34-39, Jan. 2001.

MAKHZOUM, A.; KNAPP, J. S.; OWUSU, R. K. Factors affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. **Food Microbiology**, n. 12, p. 277-290, 1995.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal General Microbiology**, v. 68, p. 337-348, 1971.

MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 147-179, Jan. 1999.

McKELLAR, R. C. Effect of sub-lethal heating and growth temperature on expression of the ribosomal RNA *rrnB P2* promoter during the lag phase of

Pseudomonas fluorescens. **International Journal of Food Microbiology**, n. 116, p. 248-259, 2007.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, p. 249-253, 2003.

MITTELMAN, M. W. Structure e functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Symposium. Biofilms: Development and Contro**l. Canadá, n. 81, p. 2760-2764, 1998.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M.; SILVA, K. C. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal Food Technology,** v. 6, n.1, p.63-68, jan./jun. 2003.

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. The growth and resistance to sodium hypochloride of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 512-520, 2000.

NOUÉR, S. A. **Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por** *Pseudomonas aeruginosa* **multirresistente**. 2005. 144 p. Tese (Doutorado em Medicina-Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro.

NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 25, p. 69-75, 1997.

OLIVEIRA, E. C. **Influência de sanitizantes na qualidade de mamão de safra e entressafra minimamente processado**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, N. M. S. **Ação sanificante do dicloroisocianurato de sódio, ozônio e ultra-som em filés de tilápia (***Oreochromis niloticus***).** 2005. 156 p.Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

O′TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, n. 54, p. 49-79, 2000.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types

of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, p. 178-185, 2008.

PALMER, R. J. Microscopy flowcells: perfusion chambers for real-time study of biofilms. **Methods Enzymol**, v. 310, p. 160-166, 1999.

PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C.; POZETTI, G. L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminium tubes both unlined and lined with epoxi resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, n. 32, p. 340-344, 2001.

POULSEN, L. V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensm.- Wiss.u-Technology**, v. 32, p. 321-326, 1999.

RESENDE, J. G. O. **Formação de biofilme em aço inoxidável por** *Pseudomonas* **spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio**. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RIBEIRO-FURTINI, L. L. **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulações de laticínio e seu comportamento frente a detergência**. 2005. 80 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RIBEIRO-FURTINI, L. L.; ABREU, L. R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 358-363, mar./abr. 2006.

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

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracet acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 61, n. 1, p. 81-85, Oct. 2000.

RULE, P. Measurement of microbial activity by impedance. In: TORTORELLO, M. L.; GENDEL, S. M. **Food microbiological analysis**: new thecnologies. IFT, 1997. Cap. 16, p.315-343, (IFT Basica Symposium Series).

SHIRTIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. Molecular interactions in biofilms. **Chemistry e Biology**, v. 9, p. 859-871, Aug. 2002.

SILEY, P.; FORSYTHE, S. A. A review: Impedance microbiology–a rapid change for microbiologist. **Journal Applied Bacteriology**, v. 80, p. 233-243, 1996.

SILLANKORVA, S. M. **Utilização de bacteriófagos no controle de células suspensas e biofilmes** de *Pseudomonas fluorescens*. 2004. 155 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho.

SMITH, J. L.; FRATÂMICO, P. M. Factores involved in the emergence and persistente of foodborne diseases. **Journal of Food Protection,** v. 58, n. 6, p. 696-708, 1995.

SONG, B.; LEFF, L. G. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiological Research**, n. 161, p. 355-361, 2006.

SOUSA, M. R. P. **Higienização de equipamentos de ordenha mecanizada canalizada:** diagnóstico de procedimentos tecnológicos. 2005. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n.4, p. 331-340, out./dez. 2004.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, abr./jun. 2005.

SPIERS, A.J.; RAINEY, P. B. The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity. **Microbiology**, n. 151, p. 2829-2839, 2005.

STEWART, P. S.; ROE, F.; RAYNER, J.; ELKINS, J. G.; LEWANDOWSKI, Z.; OCHSNER, V. A.; HASSETT, D. J. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied Enviromment Microbial**, v. 66, n. 2, p. 836-838, 2000.

SURMAN, S.; MORTON, G.; KEEVIL, B. Biofilms: an overview. **PHLS Microbiology Digest.,** v. 13, n.1, p.33-38, 1996.

TIELKER, D.; HACKER, S.; LORIS, R.; STRATHAMANN, M.; WINGENDER. J. WILHELM, S.; ROSENAU, F.; JAEGER, K. E. Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. **Microbiology**, n. 151, p. 1313-1323, 2005.

TOUTAIN, C.; CAIZZA, N. C.; ZEGANS, M. E.; O´TOOLE, G. A. Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Research in Microbiology**, n. 158, p. 471-477, 2007.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structure in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**. Belgium, n. 156, p. 626-633, 2005.

VEIGA, S. M. O. M. **Sanificação de carcaças de frango:** processos alternativos. 2003. 291 p.Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, K J. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* sp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 66, p. 2085-2095, 2000.

WIMPENNY, L.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 661-671, 2000.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial 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, July 1996.

WIRTANEN, G.; SALO, S.; HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. **Colloids e Surfaces**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 37-50, Jan. 2001.

ANEXOS

Página

ANEXO 1 A Resumo da análise de variância para o crescimento de *P.aeruginosa*, transformado por log (x+1), segundo os tratamentos estudados..... 74

ANEXO 2 A Análise do desdobramento dos níveis do fator temperatura, em cada nível do fator tempo, para *P. aeruginosa*..... 74

ANEXO 3 A Análise do desdobramento dos níveis do fator tempo, em cada nível do fator temperatura, para *P. aeruginosa*..... 74

ANEXO 4 A Resumo da análise de variância para o crescimento de *P. fluorescens*, transformado por log (x+1), segundo os tratamentos estudados..... 75

ANEXO 1 A Resumo da análise de variância para o crescimento de *P. aeruginosa*, transformado por *log (x+1)*, segundo os tratamentos estudados

e de variação	Quadrado médio (p-valor)
`p)	596,1292 (p=0,0003)
	46,6743 (p=0,2335)
	18,8323 (p=0,6572)
	30,6472
	3,7773 (p=0,5693)
	13,7465 (p=0,0373)
	2,7102 (p=0,9241)
	2,0663 (p=0,9780)
	5,1239
	43,51

ANEXO 2 A Análise do desdobramento dos níveis do fator temperatura, em cada nível do fator tempo, para *P. aeruginosa*.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio (p-valor)
Temperaturas: Tempo 2	1	62,4162 (p=0,0170)
Temperaturas: Tempo 4	1	76,6426 (p=0,0086)
Temperaturas: Tempo 6	1	64,1848 (p=0,0155)
Temperaturas: Tempo 8	1	225,5338 (p<0,0001)
Temperaturas: Tempo 10	1	222,3377 (p<0,0001)
Erro*	50	10,2285

*Quadrado médio do erro combinado (variância complexa)

ANEXO 3 A Análise do desdobramento dos níveis do fator tempo, em cada nível do fator temperatura, para *P. aeruginosa*.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio (p-valor)
Tempos: 7 °C	4	10,3965 (p=0,0977)
Tempos: 28 °C	4	7,1272 (p=0,2439)
Erro b	80	5,1239

ANEXO 4 A Resumo da análise de variância para o crescimento de *P. fluorescens*, transformado por *log (x+1)*, segundo os tratamentos estudados

Fonte de variação	gl	Quadrado médio (p-valor)
Condição (C)	4	18,3405 (p=0,8225)
Erro a	10	49,1077
Tempo (Tm)	4	3,3309 (p=0,5082)
Tm x C	16	3,6962 (p=0,5423)
Erro b	40	3,9666
CV (%)		81,11