



**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO  
INOXIDÁVEL POR *Pseudomonas* spp.  
E SEU CONTROLE POR  
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E  
DICLORO ISOCIANURATO DE SÓDIO**

**JAÍNE DAS GRAÇAS OLIVEIRA SILVA RESENDE**

2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**FORMAÇÃO DE BIOFILME  
INOXIDÁVEL POR *Pseudomonas*  
E SEU CONTROLE POR  
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO  
DICLORO ISOCIANURATO DE CÁLCIO**

**JAÍNE DAS GRAÇAS OLIVEIRA SILVA**

2005

59380

050646

**JAÍNE DAS GRAÇAS OLIVEIRA SILVA RESENDE**

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL POR  
*Pseudomonas* spp. E SEU CONTROLE POR PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO E DICLORO ISOCIANURATO DE SÓDIO**

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 - BRA  
2005**

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

**Resende, Jaíne das Graças Oliveira Silva.**

**Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas* spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio /**

**Jaíne das Graças Oliveira Silva Resende. – Lavras : UFLA, 2005.**

**85 p. : il.**

**Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Biofilme. 2. Sanitizantes. 3. Microscopia eletrônica de varredura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-576**

**-630.276**

**JAÍNE DAS GRAÇAS OLIVEIRA SILVA RESENDE**

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL POR  
*Pseudomonas* spp. E SEU CONTROLE POR PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO E DICLORO ISOCIANURATO DE SÓDIO**

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 27 de janeiro de 2005.**

**Prof. Dr. Nélio José de Andrade UFV**

**Prof. Dr. Eduardo Alves UFLA**

**Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA**

*Roberta Hilsdorf Piccoli*  
**Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli**  
**UFLA**  
**(Orientadora)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**

## ***DEDICO***

*Ao meu esposo, **Geraldo**, por ter compreendido minhas ausências em longas e freqüentes viagens para capacitação e por ter estado tão presente neste trabalho e em minha vida.*

*Aos meus pais, **Carmélio e Ilidia**, às minhas irmãs, **Janine e Janete** e à minha avó **Belina**, pelo grande incentivo dado nesta caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

A todos os professores e funcionários da Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, em especial, professores doutores **Rosane Freitas Schwan**, **Eustáquio Souza Dias**, **Romildo da Silva**, **Fátima Maria de Souza Moreira**, **Júlio Neil Cassa Louzada** e à funcionária **Magda Aparecida Melo** que, com grande ética, sabedoria e experiência tanto me acrescentaram em minha carreira acadêmica.

Ao Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras, na pessoa da Profa. Dra. **Rosane Freitas Schwan**, pelo financiamento do Curso “Introdução à Microscopia Eletrônica”, que muito enriqueceu esta pesquisa.

Ao Prof. Doutor **João Domingos Scalon**, do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de São João del-Rei, no auxílio da análise estatística deste estudo; ao Prof. Doutor **Nélio José de Andrade**, do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pela disponibilidade e atenção demonstrada no esclarecimento de questões relativas à pesquisa realizada e pela gentil doação de reagente no auxílio da realização deste trabalho; ao Prof. Doutor **Eduardo Alves**, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, no auxílio à microscopia eletrônica de varredura; à Profa. Doutora **Giovana Augusta Torres**, do Departamento de Genética Molecular da Universidade Federal de Lavras, pela disponibilidade e atenção na orientação do estudo da microscopia de epifluorescência; ao Prof. Doutor **Alexandre Tourino Mendonça** do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras e à Profa. **Maria do Pilar Canavez**, no enriquecimento desta pesquisa.

À Profa. Dra. **Rosane Freitas Schwan**, pela grande disponibilidade e apoio neste trabalho.

À Profa. Dra. **Roberta Hilsdorf Piccoli**, pelo trabalho de orientação.

Às técnicas dos Laboratórios de Microbiologia, Microbiologia dos Alimentos, Produtos Vegetais e Microscopia Eletrônica, **Ivani Maria Gervásio, Eliane M. C. Alcântara, Sandra Mara Lacerda Silva e Eloísa A. das Graças Leite Lopes**, que gentilmente colaboraram com o crescimento deste trabalho.

A todos os estagiários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em especial, às estagiárias **Belami Cássia da Silva, Lisandra Aparecida de Freitas Alves, Janete Oliveira da Silva, Lúcia Helena Teles e Rosilane Aparecida de Carvalho**, pela grande contribuição neste trabalho de pesquisa.

À funcionária **Magda Regina Bergo**, do Núcleo de Informática da Universidade Federal de São João del-Rei e **Carlos Eduardo Rodrigues Valim**, pela disponibilidade e apoio neste trabalho.

A colega, **Simone Cristina Marques** que, com grande dedicação, me auxiliou nesta pesquisa.

Aos colegas **Cláudia O. G. Nogueira, Helson Mário M. do Vale, Victor Maximiliano Reis Tebaldi, Alessandra Lima Santos Sândi e Larissa**, pelo auxílio e amizade neste processo tão importante.

Ao Senhor **Cipriano “Piano”**, pela presença amiga no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

As colegas **Aramália Karan Amaral e Fernanda Paula Carvalho**, pelo apoio oferecido durante todo o processo de formação.

A todos os meus colegas do mestrado, pelo companheirismo e pela partilha neste processo tão importante.

À **CAPES**, pelo auxílio por meio da concessão da bolsa de estudo.

# SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>CAPÍTULO 1: Aspectos gerais do processo de adesão e formação de biofilme microbiano e atuação de sanitizantes</b> .....	01
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	02
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	04
2.1 Formação de Biofilme.....	04
2.2 Fatores que influenciam a adesão microbiana.....	08
2.3 Microrganismos envolvidos em processos de adesão.....	16
2.3.1 <i>Pseudomonas</i> .....	18
2.3.1.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	18
2.3.1.2 <i>Pseudomonas fragi</i> .....	19
2.3.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
2.4 Aspectos indesejáveis e desejáveis em relação à formação de biofilmes.....	21
2.5 Métodos para avaliar a adesão e formação de biofilmes bacterianos.....	25
2.5.1 Métodos não visuais.....	25
2.5.2 Métodos visuais.....	25
2.6 Controle de adesão e prevenção da formação de biofilme.....	27
2.7 Procedimentos gerais de higienização nas indústrias de alimentos.....	29
2.8 Sanitizantes.....	30
2.8.1 Sanitizantes químicos.....	32
2.8.1.1 Compostos clorados.....	32
2.8.1.2 Peróxido de Hidrogênio.....	35
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38
<b>CAPÍTULO 2: Avaliação da formação de biofilme por <i>Pseudomonas</i> em superfície de aço inoxidável e atuação de sanitizantes na sua remoção</b> .....	43
<b>RESUMO</b> .....	44
<b>ABSTRACT</b> .....	46
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	48
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
2.1 Local.....	50
2.2 Microrganismos padrões e meio de cultura.....	50
2.3 Higienização dos cupons.....	50
2.4 Adesão das células bacterianas.....	51
2.4.1 Obtenção do inóculo.....	51
2.5 Enumeração das células de biofilme.....	51
2.5.1 Técnica do esfregaço.....	52

2.6 Sanitização.....	52
2.6.1 Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	52
2.6.2 Dicloro isocianurato de sódio.....	52
2.7 Análise dos cupons por microscopia eletrônica de varredura.....	53
2.8 Eletromicrografia.....	54
2.9 Análise Estatística.....	54
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
3.1 Adesão de microrganismos à superfície de aço inoxidável.....	56
3.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme.....	58
3.3 Atuação de sanitizantes na remoção de biofilme formado por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> em superfície de aço inoxidável.....	62
3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	69
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

## RESUMO

RESENDE, Jaíne das Graças Oliveira Silva. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas* spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio.** Lavras: UFLA, 2005. 85p. (Dissertação – Mestrado em Microbiologia Agrícola)\*.

A adesão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (*American Type Culture Collection*) 15442, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 foi avaliada em cupons de aço inoxidável AISI 304, com dimensões de 10 x 20mm e espessura de 1mm. Os cupons foram submetidos a uma higienização padronizada e imersos em 60mL de caldo TSB e 10mL das culturas bacterianas contendo cerca de  $10^5$  UFC/mL de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* e incubados a 37°C, 26°C e 30°C, respectivamente. Após 48, 96, 144, 192 e 240 horas, os cupons foram removidos, lavados sob agitação branda, com tampão fosfato salino estéril (PBS, pH 7,4), para remoção das células não aderidas. Em seguida, os cupons foram submetidos à técnica do esfregaço para enumeração das células aderidas, em ágar TSA e incubados a 37°C, 26°C e 30°C, respectivamente, por 24 horas. No teste de sensibilidade das células do biofilme, foram usadas as soluções de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 5% e dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L como sanitizantes. Dois cupons contendo biofilme, para cada cultura bacteriana, foram imersos em 5mL de cada solução, durante 1 minuto. A seguir, os cupons foram transferidos para uma solução neutralizante de tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) a 0,1M por 30s, enxaguados com PBS e as células enumeradas em ágar TSA e incubação de 37°C, 26°C e 30°C, respectivamente, por 24 horas, após o uso do *swab* padrão estéril e vórtex por 2 minutos. Para a visualização das imagens no microscópio eletrônico de varredura (MEV), um cupom de cada cultura de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* contendo biofilme, após ser sanitizado, foi imerso em solução fixativa (Karnovisk's, pH 7,2) por 15 dias. Após este período, os cupons foram lavados 3 vezes por 10 minutos com tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora à temperatura ambiente em uma capela. Em seguida, foram lavados 3 vezes em água destilada e desidratados em gradiente de acetona por 3 vezes (25%, 50%, 75%, 90% e 100%). Os cupons

---

\* Comitê Orientador: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Orientadora), Prof. Dr. Eduardo Alves – UFLA e Prof. Dr. Nélcio José de Andrade – UFV.

foram levados ao aparelho de ponto crítico com o objetivo de finalizar o processo de desidratação, montados em *stubs* e cobertos com ouro. Após este procedimento, as amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura. Para a técnica de contagem padrão em placas (CPP), a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa ( $P \geq 0,05$ ) no número de microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável. Portanto, a capacidade de aderência foi a mesma para os três microrganismos estudados. Os resultados para a CPP apresentaram uma adesão máxima em torno de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>, indicando a formação de biofilme. Os sanitizantes peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio foram eficazes na remoção dos biofilmes, entretanto, a análise estatística a 5% de probabilidade mostrou que houve uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação aos sanitizantes químicos utilizados. Peróxido de hidrogênio, nas condições utilizadas, foi mais efetivo na remoção dos biofilmes formados por *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens*. Nesta pesquisa, a ação dos sanitizantes sobre as células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* apresentou valores acima de 3 reduções decimais (RD), sendo aprovados, pois, segundo a APHA (*American Public Health Association*), para a sua aprovação, em testes de suspensão, os sanitizantes usados na remoção de células sésseis com vórtex, necessitam obter, no mínimo, 3RD. A MEV comprovou a adesão e formação de biofilme sobre a superfície de aço inoxidável, além de verificar a eficácia dos sanitizantes na remoção do biofilme.

## ABSTRACT

RESENDE, Jaíne das Graças Oliveira Silva. **Formation of biofilm on stainless steel by *Pseudomonas* spp. and its control by hydrogen peroxide and sodium isocyanurate diclorous.** Lavras: UFLA, 2005. 85p. (Dissertation – Master's degree in Agricultural Microbiology)\*.

The adherence of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 15442, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 has been evaluated on stainless steel coupons AISI 304, measuring 10 x 20mm and 1mm in thickness. The coupons were submitted to a standard hygienics procedure and immersed in 60mL of fluid TSB and 10mL of the bacterial culture holding around  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> of *P. aeruginosa*, *P. fragi* and *P. fluorescens* and incubated at 37°C, 26°C and 30°C, respectively. After 48, 96, 144, 192 and 240 hours, the coupons were removed, washed under soft shaking, with sterilized buffer phosphate saline (PBS, pH 7.4), to remove the cells which had not been adhered. Afterwards, the coupons were subjected to the rubbing or scrubbing techniques to enumerate the cells which had been adhered, in agar TSA and incubated at 37°C, 26°C and 30°C, respectively, for 24 hours. For the sensibility test of the biofilm cells, the solutions of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 5% and sodium isocyanurate diclorous at 100mg/L as sanitizers were used. Two coupons carrying biofilm, for each bacterial culture, were immersed in 5mL of each solution, for 1 minute. Following, the coupons were transferred to a sodium thiosulphate neutralizing solution (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) at 0,1M for 30s, rinsed with PBS and the cells enumerated in agar TSA and incubated at 37°C, 26°C and 30°C, respectively, for 24 hours, after the use of *swab* sterile standard and the vortex, for 2 minutes. For the visualization of the images on the scanning electron microscopy (SEM), one coupon of each culture of *P. aeruginosa*, *P. fragi* and *P. fluorescens* carrying biofilm and after having been sanified, were immersed in fixative solution (Karnovisk's pH 7,2) for 15 days. After this period, the coupons were rinsed 3 times, for 10 minutes with cocodylate buffer and post-fixed in osmium tetroxide 1% in water for 1 hour at room temperature in a glass-inclosed compartment used for chemical experiments. Afterwards, they were rinsed for 3 times with distilled water and

---

\* Guidance Committee: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Adviser), Prof. Dr. Eduardo Alves – UFLA and Prof. Dr. Nélio José de Andrade – UFV.

dehydrated in acetone gradient for 3 times (25%, 50%, 75%, 90% and 100%). The coupons were taken to the critic point dryer with the purpose of finalizing the process of dehydration, set on *stubs* and cotted with gold. After these procedures, the samples were examined in scanning electron microscopy. For the standard counting technique in plaques (CPP), the statistics analysis showed that there has not been a significative difference ( $P \geq 0,05$ ) on the number of microorganisms adhered to the stainless steel surface. Thus, the capacity of adherence was the same for the three studied microorganisms. The results for the CPP showed a maximum adherence around  $10^6$  to  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>, indicating the formation of biofilm. The sanitizers, hydrogen peroxide and sodium isocyanurate diclorous, were efficient on the removal of biofilms, however, the statistical analysis at 5% of probability showed that there has been a significant difference ( $P < 0,05$ ) in relation to the chemical sanitizers used. Hydrogen peroxide, on the conditions used here, was more effective on the removal of biofilms formed by *P. aeruginosa*, *P. fragi* and *P. fluorescens*. The action of sanitizers over the cells of *P. aeruginosa*, *P. fragi* and *P. fluorescens* showed values over 3 decimal reductions (RD), being approved, since, according to APHA (*American Public Health Association*), for the approval, in suspension tests, the sanitizers used on the removal of sessile cells with vortex, need to obtain, at least, 3RD. The SEM confirmed the adhesion and formation of biofilm on the stainless steel surface, besides checking the efficiency of sanitizers on the removal of biofilm.

## **CAPÍTULO 1**

# **ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO DE ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME MICROBIANO E ATUAÇÃO DE SANITIZANTES**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os processos de higienização aplicados aos equipamentos das indústrias devem ser eficazes para reduzir os índices de contaminação nestas fontes. Superfícies mal higienizadas continuam contendo elevado número de microrganismos e outras sujidades, favorecendo a adesão daqueles sobre a superfície não limpa. Uma vez aderidos, há a formação de biofilmes que, por sua vez, são difíceis de remoção pelos procedimentos de limpeza diários e tratamentos de sanitização.

As indústrias demonstram grande interesse pela formação de biofilmes, pois os microrganismos sésseis são mais difíceis de serem eliminados do que as células planctônicas. A grande causa da baixa qualidade dos produtos alimentícios é justamente a contaminação microbiana.

O conceito de biofilme não surgiu recentemente e estudos mostraram a colonização de células bacterianas na superfície utilizada. Estas técnicas foram primeiramente descritas por Zobell (1943) e, a partir deste experimento, foi publicado o primeiro artigo sobre biofilme. O seu aparecimento pode ocorrer em quase todas as superfícies nas quais microrganismos viáveis estão presentes. Aderindo a substrato sólido, que podem ser animados ou inanimados, vivos ou mortos e, ou, na forma orgânica ou inorgânica. Estes são pré-requisitos para adquirirem vida normal e reprodutiva (Kumar & Anand, 1998).

A capacidade de adesão sobre determinada superfície é diferente de organismo para organismo, e estes, quando aderidos, apresentam resistência maior à ação dos sanitizantes. Por isso, é importante evitar a formação de biofilmes pois a adesão de microrganismos nas superfícies de equipamentos faz com que células bacterianas sejam liberadas sempre, contaminando o alimento. Este tipo de problema é bastante comum nas indústrias de leite, devido à má-

pasteurização do produto e por apresentar índice elevado de microrganismos, especialmente no Brasil (Figueiredo, 2000).

A necessidade de se efetuar procedimentos de sanitização adequados e eficientes nos equipamentos e utilizar sanitizantes químicos ou físicos para manutenção da qualidade dos alimentos pode evitar a formação de biofilmes. Os sanitizantes químicos mais utilizados na indústria de alimentos são: hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, ácido peracético ou clorhexidina, sendo estes, na sua maioria, agentes oxidantes. Na tentativa de inativar os microrganismos, a quantidade de produto químico a ser usada não é tão importante, mas sim os resíduos deste no meio após a quantidade do produto ter sido atendida (Andrade & Macêdo, 1996).

Os sanitizantes são escolhidos com base em testes em laboratórios, como diluição de uso e de suspensão, testes do *swab*, da rinsagem e da placa de contato, conhecidos como testes em uso e testes de uso simulado, adaptando as condições da indústria no laboratório, fornecendo informações mais próximas da realidade (Akutsu, 2001).

Diante dos problemas enfrentados pelas indústrias de alimentos para reduzir os índices de contaminação por microrganismos patogênicos e ou alteradores, realizando procedimentos de limpeza e sanitização adequados e eficazes, os objetivos gerais deste trabalho foram avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme por *Pseudomonas* e a atuação de sanitizantes em superfície de aço inoxidável.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Formação de biofilme

Biofilme é uma comunidade microbiana aderida a substrato e embebida por matriz constituída de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). É importante reservatório de bactérias, fungos, algas e protozoários, que merece particular atenção nas indústrias de processamento de alimentos e leite (Sharma & Anand, 2002). Esta população heterogênea de microrganismos é ubíqua na natureza, ou seja, capaz de colonizar ambiente úmidos e não-estéreis e representa populações de células que possuem interdependência funcional uma sob as outras e, coletivamente, oferece atividades microbianas que não são possíveis por nenhuma das espécies individuais (Gilbert et al., 2003).

As bactérias formadoras de biofilme podem viver de forma livre, (bactérias planctônicas) ou em comunidades aderidas a um substrato (bactérias sésseis) (Shirtliff et al., 2002). As células bacterianas podem formar biofilme em superfícies de aço inoxidável, vidro, alumínio, teflon, materiais de náilon e borracha encontrados em ambientes utilizados para processar alimentos.

Existem várias teorias que tentam explicar a formação de biofilme. A primeira, segundo Zottola & Sasahara (1994), ocorre em duas etapas: adesão reversível e adesão irreversível. A primeira etapa implica na adesão reversível em que várias forças de interações fracas como forças de van der Waals, eletrostáticas e interações hidrofóbicas estão influenciando neste processo. Neste estágio, a célula bacteriana pode apresentar movimento browniano e ser facilmente removida por determinadas forças. A adesão irreversível, como mencionam Kumar & Anand (1998), é muito importante, pois a presença de forças repulsivas impede a adesão de células bacterianas diretamente à superfície, mas, o contato pode ocorrer devido à produção de flagelos, fimbrias,

pilli e material extracelular polissacarídico pelas bactérias. Nesta etapa, várias forças de interações estão envolvidas: dipolo-dipolo, hidrogênio, iônica e covalente, além das interações hidrofóbicas. Arcuri (2000) relata que as EPS formam ponte entre o substrato e a célula bacteriana funcionando como cola, tornando essa associação irreversível e de difícil remoção.

Segundo Zottola & Sasahara (1994), outra teoria é proposta para a formação do biofilme. Primeiramente, há o transporte de moléculas orgânicas, nutrientes e células para a superfície, formando uma camada de nutrientes sobre ela. Num segundo momento, as células bacterianas vão aderindo à superfície com conseqüente multiplicação celular associada à síntese das substâncias poliméricas extracelulares, deteriorando, às vezes, o alimento.

De acordo com Mosteller & Bishop (1993), após o contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a produção de finas fibras vistas em microscopia eletrônica. Estas se tornam mais grossas com o tempo, formando a matriz de biofilme. Dentro da matriz, como cita Arcuri (2000), outras substâncias orgânicas e inorgânicas podem existir juntamente com os metabólitos microbianos e outros microrganismos que juntos formam o biofilme protegido pelo glicocálix. Kumar & Anand (1998) relatam que a produção exopolissacarídica aumenta com a colonização de células bacterianas sobre a superfície e reduz caso haja a reinoculação das células do biofilme em meio líquido, como células planctônicas.

Outra teoria é proposta por Busscher & Weerkamp (1987), citados por Figueiredo (2000), em relação à formação do biofilme, como mostrado na Figura 1.

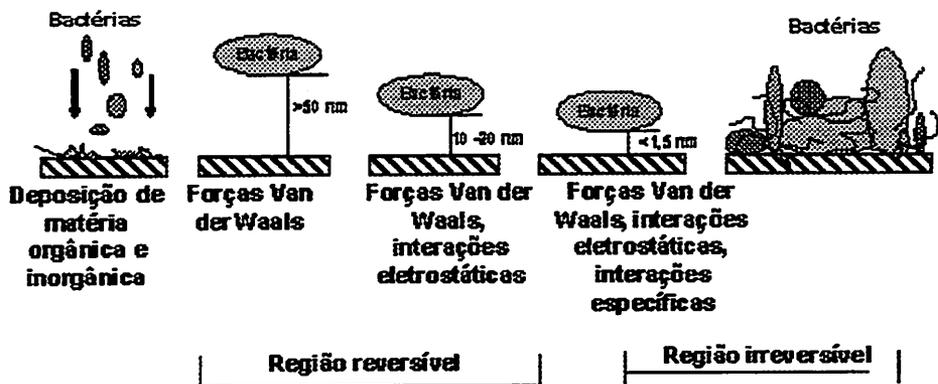
Segundo Bower et al. (1996), a uma distância de separação maior que 50 nm, somente as forças atrativas de Van der Waals atuam na adesão da bactéria ao substrato. Essa distância é relativamente grande para a oposição de forças e o

reconhecimento de componentes específicos de superfície. A aproximação é mediada por propriedades não-específicas da superfície da célula.

A uma distância entre 10 e 20 nm, como relatam Hood & Zottola (1995), ocorrem interações em virtude da repulsão eletrostática, força que se opõe às forças de Van der Waals. Neste estágio, é possível que a adesão seja reversível, porém, se altera com o tempo para pouco reversível ou essencialmente irreversível, em razão do rearranjo da superfície da célula, o que leva a interações de curta distância.

A uma distância menor que 1,5 nm, em que a barreira da energia potencial já foi superada, interações específicas, como as que podem se originar de forças polares de curta distância, podem ocorrer. Essas interações podem levar à ligação essencialmente irreversível (Hood & Zottola, 1995).

Leite et al. (2002) propõem um modelo para explicar a adesão de microrganismos a superfícies. A primeira etapa ocorre quando o microrganismo é atraído apenas pelas características da superfície. Desse modo, a superfície



Fonte: Adaptado de Busscher e Weerkamp (1987), Characklis (1984), Marshall (1971), Nortermans et al. (1991) citado por Zottola e Sasahara (1994).

**FIGURA 1** Mecanismo teórico de vários estágios de adesão e formação de biofilme.

carregada negativamente do microrganismo pode ser atribuída à presença de enxofre. Dentro deste contexto, cálcio e magnésio (cátions divalentes) são capazes de formar um agente cimentante carregado negativamente entre o microrganismo e a superfície. A alta densidade das cargas negativas pode atrair alguns cátions, como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , que são mais firmemente associados às cargas negativas nas paredes celulares do que cátions monovalentes, como o  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ .

De acordo com Drenkard (2003), o contato direto entre bactéria e substrato pode ser estabelecido por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas pelos próprios microrganismos.

Hall-Stoodley & Stoodley (2002) relatam que as EPS, que são secretadas pelos microrganismos durante o crescimento, consistem de várias substâncias orgânicas, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Entretanto, a função exata das EPS não está totalmente esclarecida devido à sua natureza extremamente heterogênea. As EPS contêm vários grupos funcionais, como carboxil, amina e grupo fosfato, além de exercer papel importante na formação e função das colônias microbianas, incluindo a adesão, a formação do glicocálix e processos fisiológicos (Beech & Sunner, 2004). Em particular, as EPS influenciam significativamente na adesão bacteriana sob superfícies/substratos sólidos, onde iniciam a formação de biofilme, porque, no momento em que as EPS cobrem a superfície da célula, há alteração das características físico-químicas da superfície como carga, hidrofobicidade e propriedades poliméricas (Tsuneda et al., 2003).

Por ser matriz polissacarídica polianiónica hidratada e estar afixada no componente lipopolissacarídico da parede celular, as EPS protegem a célula da desidratação, já que podem reter água em quantidades muito maiores que a sua massa e se desidratam lentamente (Morton et al., 1998).

As substâncias polissacarídicas extracelulares também ajudam na colonização do biofilme por outras espécies. Com a mistura de espécies dentro

do biofilme, as EPS produzidas podem aumentar a estabilidade destas espécies e ou estabilizar interações que podem ocorrer entre polímeros de diferentes espécies (Kumar & Anand, 1998).

O glicocálix é elemento integrante da membrana externa das bactérias gram-negativas e do peptidoglicano das bactérias gram-positivas. É formado pela adesão superficial dos microrganismos e oferece condições para que estas estruturas se fixem à superfície. É rígido e sobrevive em ambientes hostis. Isto bloqueia e retém os nutrientes para o crescimento de biofilme, além de oferecer proteção às células dos planctônicos efeitos de agentes antimicrobianos (Tortora et al., 2000). É composto de fibras polissacarídicas ou proteínas globulares e, na fase hidratada, contém cerca de 98%-99% de água (Alberts et al., 1999).

## **2.2 Fatores que influenciam a adesão microbiana**

A adesão microbiana e a formação de biofilme ocorrem devido à colonização de comunidades de microrganismos sobre determinada superfície de contato onde se fixam e iniciam o processo de multiplicação celular (Shirreff et al., 2002).

Existem alguns fatores que interferem na adesão microbiana sobre a superfície de contato. Dentre eles incluem-se as características dos microrganismos, como espécie, concentração de microrganismos, produção de EPS, hidrofobicidade, carga elétrica superficial, flagelo, fimbria e pilli; as características do material aderente, como carga e microtopografia e as características do meio envolvendo o microrganismo, como pH, temperatura, tempo de contato e agitação (Bower et al., 1996; Zottola & Sasahara, 1994).

A adsorção de macromoléculas solúveis, como proteínas, sob a superfície sólida também pode influenciar na adesão microbiana. Geralmente, estas superfícies de contato tornam-se rapidamente protegidas. Assim, 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 (Bower et al., 1996).

Flint et al. (2000) citaram algumas pesquisas em que algumas características de superfície influenciam na adesão e crescimento bacteriano. Por exemplo, os estudos correlacionam irregularidades da superfície à habilidade da célula em se aderir à superfície.

Pode-se sugerir que a adesão bacteriana depende da espécie bacteriana, do tipo de superfície, dos fatores físico-químicos, do volume do fluido e do método utilizado para avaliar a aderência bacteriana sobre determinada superfície.

A microtopografia da superfície também interfere no processo de adesão bacteriana. As superfícies altamente carregadas, como vidro, suportam melhor o processo de aderência do que as superfícies menos carregadas, como o poliestireno (Zottola & Sasahara, 1994). Atualmente, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a de força atômica (MFA) tem sido utilizada no sentido de proporcionar uma visualização tridimensional da microtopografia de superfície (Hilbert et al., 2003).

Segundo Hilbert et al. (2003), as características físicas e químicas da superfície podem ser modificadas na tentativa de reduzir a colonização bacteriana, limitando, assim, a adesão microbiana como, por exemplo, o polimento das superfícies de aço inoxidável.

A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são importantes forças físico-químicas envolvidas no processo de adesão de microrganismos. Entretanto, a relevância de cada um desses fatores depende da espécie bacteriana e do tipo de superfície de contato (Flint et al., 2000). A hidrofobicidade está relacionada à membrana externa da célula bacteriana e é de grande importância no processo de adesão microbiana não-específica. Estudos feitos com cianobactéria com o objetivo de investigar suas propriedades

hidrofóbicas determinaram que as suas regiões hidrofóbicas eram localizadas ao longo de seus filamentos. A remoção da parede celular diminuiu o índice de colonização desse microrganismo e confirmou que os sítios hidrofóbicos eram responsáveis pelo aumento dos níveis de colonização, provavelmente pela localização das regiões hidrofóbicas (Zottola & Sasahara, 1994). Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade, dependendo do modo de crescimento bacteriano e das condições da cultura (Zottola & Sasahara, 1994).

A carga elétrica da superfície também está associada às células microbianas envolvidas na adesão bacteriana, porém, segundo Flint et al. (2000), a sua importância não está totalmente elucidada, visto que, como as células bacterianas gram-positivas e gram-negativas possuem carga elétrica negativa, em pH neutro, esta pode aumentar ou diminuir, dependendo do microrganismo e das condições do ambiente. Segundo Wicken (1985), citado por Macêdo (2001), a carga elétrica negativa das bactérias gram-negativas é originária dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa, em conjunto com os polímeros do glicocálix e das gram-positivas dos ácidos teicóicos e teicurônicos da parede e dos polipeptídeos do glicocálix.

A adsorção de íons ou ionização de grupos de superfície favorece tanto bactéria quanto substrato a adquirirem cargas superficiais que, na maioria das vezes, são negativas. Todavia, esta similaridade de cargas causa repulsão entre bactéria e substrato. Porém, estas cargas de superfície podem atrair íons com carga contrária, que estão presentes na fase aquosa circundante. Assim, quando as células são atraídas para a superfície do substrato, interações começam a ocorrer com produção de substâncias exopoliméricas, formando ponte entre o microrganismo e o substrato, embora a produção destas EPSs não dependa das mesmas interações eletrostáticas (Zottola & Sasahara, 1994).

O pH e a temperatura da superfície de contato também são fatores que influenciam no grau de adesão dos microrganismos. *Pseudomonas fragi* apresentou adesão máxima em superfície de aço inoxidável quando cultivada a pH entre 7 e 8, ótimo para o seu metabolismo. A uma temperatura de 23°C e sob a mesma superfície de contato, *P. fragi* também demonstrou ótima aderência. *Yersinia enterocolitica* aderiu melhor em superfície de aço inoxidável, quando incubada à temperatura de 21°C do que a 35°C ou 10°C (Kumar & Anand, 1998).

A matriz de biofilme é composta, aproximadamente, de 97% de água, embora isto dependa do sistema específico a ser examinado. A água pode entrar na cápsula das células microbianas ou estar presente na forma de solvente e suas propriedades físicas são determinadas pela dissolução de solutos na cápsula. O movimento da água dentro da matriz de biofilme favorece os processos de difusão que ocorrem no seu interior. A água é organizada dentro da fina estrutura do biofilme (Sutherland, 2001).

É evidente que a matriz de biofilme é um complexo no qual polímeros são secretados, nutrientes e metabólitos absorvidos, produtos da lise celular e até material particulado e detritos do ambiente vizinho são agregados. Todas as macromoléculas, como proteínas, RNA, DNA e polissacarídeos, podem ser adicionados ao peptidoglicano, lipídeos e fosfolipídeos, dentre outros. A quantidade de material celular dentro do biofilme varia por si mesmo. Valores para o carbono orgânico total sugerem que o material celular representa em torno de 2%-15%, sendo o restante extracelular na natureza (Sutherland, 2001).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem mostrado algumas informações novas sobre a complexidade estrutural dos biofilmes e tem confirmado a sua heterogeneidade (Sutherland, 2001).

De acordo com alguns estudos, a matriz de EPS não é tão necessária para a colonização inicial de células bacterianas sobre as superfícies, mas é

fundamental para o desenvolvimento da estrutura da matriz de biofilme. Segundo Sutherland (2001), a estrutura da matriz de biofilme varia de acordo com as células microbianas presentes, sua fisiologia, os nutrientes disponíveis e suas condições físicas. Os poros formados em todo o sistema permitem a passagem de nutrientes, enzimas, metabólitos e outros solutos. As diferenças na densidade da matriz de biofilme também dependem da natureza da comunidade microbiana, sua atividade metabólica e secreção de polímeros extracelulares, dentre outras atividades.

A distribuição dos microrganismos dentro do biofilme não é uniforme. O seu crescimento na matriz é intercalado por canais de água altamente permeáveis. A composição do biofilme é heterogênea, devido à presença de grande número e variados microrganismos com várias propriedades fisiológicas e metabólicas como resposta ao pH e requerimentos nutricionais ocorrendo dentro da EPS. Como resultado, em um mesmo biofilme, é possível encontrar comunidades aeróbicas e anaeróbicas isoladas. *Pseudomonas aeruginosa* prefere a base do biofilme, enquanto *Vibrio parahaemolyticus* encontra-se próximo à interface líquida. Pode ocorrer interdependência entre as espécies, contribuindo para o aumento da resistência a agentes antimicrobianos (Kumar & Anand, 1998; Morton et al., 1998).

A composição da matriz depende do substrato e metabólitos. Denyer et al. (1993), citados por Figueiredo (2000), selecionaram algumas células que estavam em crescimento exponencial e submeteram-nas a condição de stress. Verificou-se que houve a liberação de polissacarídeo viscoso e solúvel, ao passo que este polissacarídeo não foi liberado no momento em que estas células estavam na fase estacionária. Concluiu-se que diferentes polímeros são produzidos sob situações de stress. Observou-se que bactérias estressadas produzem menos polissacarídeos que culturas em crescimento. Em meio de crescimento rico, a bactéria pode produzir grandes quantidades de polímeros. No

entanto, libera-os na forma de limosidade não os utilizando na formação da cápsula.

Células bacterianas sob inanição causam queda no seu crescimento. Na fase exponencial, o seu crescimento ou a sua paralisação são acompanhados pelo aumento na resistência a antibióticos. Estudos recentes sugerem que o baixo crescimento das células dentro do biofilme não é causado propriamente pela escassez de nutrientes, mas por resposta ao stress iniciado pelo crescimento dentro do biofilme. Esta idéia tem chamado a atenção pois a resposta ao stress exige trocas fisiológicas que agem protegendo a célula de várias situações como efeitos ao calor, frio e alterações de pH, entre outros (Mah & O'Toole, 2001).

Em ambientes naturais, as células microbianas necessitam adaptar-se a alterações no meio vizinho, mas as células dentro da matriz de biofilme não necessitam desta adaptação, pois a matriz proporciona troca de nutrientes orgânicos. Como muitos dos polímeros da matriz são de natureza aniônica, podem ligar-se aos cátions e proporcionar reserva desses nutrientes. A própria matriz pode funcionar como reserva de energia e carbono. Os microrganismos, normalmente, não utilizam EPSs que eles sintetizam, mas espécies heterogêneas dentro da matriz são capazes de degradar e utilizar o EPS, alterando assim a composição e estrutura do biofilme (Sutherland, 2001).

As células microbianas estão muito próximas umas das outras na matriz de biofilme. Por isso, a competitividade por nutrientes disponíveis é muito grande. Devido a essa proximidade, os agentes antimicrobianos que entram na matriz acabam destruindo as células vizinhas (Sutherland, 2001).

O contato entre as células bacterianas e a superfície é facilitado pela presença de fimbrias, pilli e flagelos que ajudam na aderência da bactéria com a superfície (Kumar & Anand, 1998), mas outras estruturas têm diferentes funções em diversas espécies e sob diferentes condições ambientais (Stickler, 1999).

A estrutura da comunidade de biofilme varia com a localização, a natureza dos microrganismos e a disponibilidade de nutrientes. O biofilme produzido por *P. aeruginosa* sob condições nas quais a fase aquosa, rica em nutrientes, é contínua sob a superfície colonizada, tem sido utilizada como modelo para estudos de desenvolvimento de biofilme. Assim, células colonizadas produzem polissacarídeo extracelular e migram até a superfície lentamente. As células formam, juntas, pequenos agrupamentos no pilar ou estruturas em forma de cogumelo. Canais cheios de água são formados entre estas pequenas colônias constituindo sistema circulatório primitivo, distribuindo nutrientes e removendo produtos desnecessários para as comunidades de células nas microcolônias (Costerton et al., 1995, citados por Stickler, 1999).

Qualquer superfície na qual exista a presença de microrganismos viáveis, pode ocorrer a formação de biofilme, estabelecendo o que se chama condicionamento da superfície (Hood & Zottola, 1995). Substâncias orgânicas e inorgânicas, como proteínas do leite e carne, podem formar filme condicionante na superfície do equipamento. Essas substâncias e os microrganismos são transportados para a superfície por difusão ou por fluxo turbulento do líquido. O acúmulo de substâncias na interface sólido-líquido na superfície de contato dos alimentos (filme condicionante) leva a maior concentração de nutrientes, se comparado à fase fluída. Os nutrientes são mais rapidamente transferidos para o biofilme do que para as células bacterianas na fase aquosa, favorecendo a formação do biofilme que também é dependente da espécie competitiva de cultura (Zottola & Sasahara, 1994; Kumar & Anand, 1998). Além do condicionamento da superfície, de acordo com Arcuri (2000), a microtopografia da superfície é importante no que diz respeito à habilidade do microrganismo em aderir àquela superfície. Dependendo da topografia, a bactéria não é atingida pelos métodos de limpeza, seja por causa da sua resistência a esses métodos ou pelo uso inadequado e o biofilme não é removido.

Colonizadores primários são os microrganismos que aderem primeiro à superfície, favorecendo a adesão de espécies compatíveis. A presença desses colonizadores primários inibe, mas não impede, a aderência de outras bactérias. Estes colonizadores primários modificam as características da superfície aderida pelo seu crescimento e reprodução, contribuindo para a adesão de bactérias secundárias, detritos orgânicos e minerais, dentre outros (Beech & Sunner, 2004).

Em comunidades naturais, como relatam Denyer et al. (1993), citados por Figueiredo (2000), a mistura de bactérias gera estrutura complexa para o biofilme. O microrganismo colonizador inicial proporciona um ambiente no qual as bactérias compatíveis são favorecidas no processo de adesão, enquanto aquelas incompatíveis são inibidas. *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa* em monoespécies formam um biofilme com espessura de 15 a 30µm, respectivamente, enquanto no biofilme, em ambas espécies, a espessura foi de 40µm. Mas, em alguns estudos, como mencionam Kumar & Anand (1998), *P. aeruginosa*, em cultura pura, forma biofilme com espessura de, no máximo, 50µm de espessura, enquanto em uma cultura mista a espessura pode exceder 120µm.

De acordo com a teoria relatada por Zottola & Sasahara (1994), primeiramente há o transporte de moléculas orgânicas, nutrientes e células para a superfície formando uma camada de nutrientes sobre ela. O próximo passo é a aderência dos microrganismos sobre a superfície com conseqüente multiplicação celular associado à síntese de EPS, deteriorando, às vezes, o alimento, pela liberação de células do biofilme. Estudos realizados por Sasahara & Zottola (1993) demonstraram que *P. fragi*, microrganismo dominante e colonizador primário e *Listeria monocytogenes*, microrganismo patogênico, juntos, colonizaram e formaram biofilme na superfície de aço inoxidável e vidro. *Listeria monocytogenes* colonizou a superfície de vidro mais fortemente quando

houve a produção de EPS no meio e *P. fragi* estava presente na cultura. Quando as duas espécies estão crescendo juntas, a matriz estabelecida por *Pseudomonas* parece envolver as células de *Listeria* ao biofilme. Estes fatores sugerem que a habilidade de colonizar uma superfície é mais importante do que o seu crescimento sobre esta superfície.

Segundo Denyer et al. (1993), citados por Figueiredo (2000), o biofilme, após a etapa de crescimento, passa pela fase de liberação de células, que ocorre de duas formas: primeiramente, há a erosão, na qual o microrganismo presente no biofilme, principalmente as células filhas, sofrem contínua remoção. Num segundo momento, ocorre a liberação esporádica de partículas maiores do biofilme. A liberação de células por erosão pode ser influenciada por fatores ambientais, químicos ou alteração das propriedades da superfície de contato ou da bactéria. Entretanto, como relatam Denyer et al. (1993), citados por Figueiredo (2000), quando há cálcio livre na água, a taxa de erosão diminui em biofilme de *P. aeruginosa*. Se o substrato está altamente carregado e o fluxo é laminar, a liberação esporádica ocorre com maior frequência. Assim, células podem ser transportadas para novos sítios e reiniciar o processo de formação de biofilme.

### 2.3 Microrganismos envolvidos em processos de adesão

Grande número de microrganismos patogênicos e alteradores de alimentos é capaz de participar, com maior ou menor intensidade, dos processos de adesão. Dentre os patogênicos estão *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* e, entre os alteradores, podem-se citar *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *Micrococcus* sp., *P. fluorescens* e *Enterococcus faecium* (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002).

Manipuladores de alimentos podem apresentar grau de tolerância baixo em relação a bactérias como *Salmonella* e *Listeria*, microrganismos estes com

potencial para aderência e formação de biofilme. A partir deste fato, é possível introduzir o conceito de potencial de biotransferência. Esta definição não se enquadra na definição clássica de biofilme, mas àquela em que todos os microrganismos associados à superfície apresentam potencial risco de contaminação aos alimentos (Hood & Zottola, 1995).

Zottola & Sasahara (1994) observaram bom crescimento de *P. fragi* em superfície irregular de aço inoxidável, assim como Parizzi (1999), em seus estudos, avaliou a adesão bacteriana em cupons de aço inoxidável AISI 304, polipropileno (usado na fabricação de placas para corte de carne e legumes) e policarbonato (usado na confecção de mamadeiras). Os microrganismos utilizados foram *Listeria innocua* L6a e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e os resultados indicaram que os microrganismos apresentam capacidade de adesão às superfícies de aço inoxidável, polipropileno e policarbonato, e que esses processos de adesão, quando não convenientemente controlados, podem tornar-se fontes de infecção hospitalar.

Parizzi (1999) ressalta, ainda, que a avaliação realizada por EPF (microscopia de epifluorescência), após 10 e 12 horas, encontrou de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, tanto para a *L. innocua* quanto para *S. aureus*, independente da superfície avaliada, e que estes valores indicam processo de adesão bacteriana e não formação de biofilme. Entende-se que, para ser considerado um biofilme, o número de células aderidas deve estar entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, ou seja, entre 10 a 100 vezes acima dos valores encontrados neste experimento.

Pesquisa realizada por Figueiredo (2000), utilizando modelo de circuito de processamento de leite em aço inoxidável com cupons de prova em aço inoxidável, mostrou que *P. aeruginosa*, com 12 horas de contato, atinge valores na ordem de  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> na superfície dos cupons.

Outro fator relevante refere-se ao fato de que as células em biofilme podem ser viáveis mas não cultiváveis (VBNC – *viable-but-non-culturable*).

Isso significa dizer que elas não irão crescer num meio de cultura normalmente utilizado para sua detecção. Ressalta-se a necessidade de estabelecer procedimentos de higienização corretos, ou seja, um “Procedimento Operacional Padrão de Higiene (SSOP’s – *Sanitizing Standard Operating Procedures*) (Arcuri, 2000).

### 2.3.1 *Pseudomonas*

Segundo Sorhaug & Stepaniak (1997), as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* estão comumente envolvidas na formação de biofilme.

São bastonetes gram-negativos, com flagelo polar e sintetizam grande número de enzimas diferentes como as lipases e proteases. Muitas têm a capacidade de excretar pigmentos extracelulares, solúveis em água que difundem no seu próprio meio (Sorhaug & Stepaniak, 1997; Tortora, 2000).

#### 2.3.1.1 *Pseudomonas fluorescens*

São bastonetes não esporulados, aeróbios obrigatórios, exceto algumas que podem utilizar o NO<sub>3</sub> como aceptor de elétrons no lugar do O<sub>2</sub>. Não são muito exigentes quanto a necessidades nutricionais e crescem bem em meio com sais minerais suplementados com várias fontes de carbono. A temperatura ótima de crescimento é de 25°C - 30°C (Tortora, 2000).

Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade que *P. fluorescens* e *Pseudomonas* spp. têm de antagonizar o crescimento de determinados patógenos. Este efeito antagonístico foi relatado por Freedman, Kondo e Wilbert (1989), citados por Santos (1998), em estudos realizados com cepa de *P. aeruginosa*, no qual se observou a inibição do crescimento de cepas de *P. phaseolicola*, *P. pisi*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. fragi*. A justificativa para tal evento ocorrer, provavelmente, é o envolvimento de sideróforos. Segundo Moore-Landecker (1996), sideróforos são moléculas com alta afinidade por ferro

e, desse modo, seqüestram o ferro disponível e aumentam conteúdo de ferro da cepa produtora diminuindo, assim, o conteúdo de ferro disponível para os outros organismos presentes no meio. Sendo o ferro um componente fundamental a muitos sistemas de enzimas em todas as células vivas, e necessário na síntese de enzimas que contenham, ou não, o grupo heme para o crescimento de bactérias e fungos, os microrganismos produtores destas substâncias podem impedir o crescimento de outros organismos presentes no mesmo ambiente por seqüestrarem o ferro disponível. A produção de sideróforos por *Pseudomonas* spp. pode permiti-las estabelecer populações dominantes, mas quando há baixa disponibilidade de ferro no meio, *P. fluorescens* produz um pigmento fluorescente solúvel e esverdeado.

Experimentos com *P. fluorescens* que apresentavam deficiência na capacidade de adesão em superfície mostraram que este microrganismo, quando crescido em meio com citrato, glutamato ou minimamente suplementado com ferro, recuperou a capacidade da célula para iniciar a formação do biofilme, embora não tenha restaurado a motilidade. Logo, foi sugerido que *P. fluorescens* possui várias estratégias para iniciar a adesão e que essas estratégias dependem de sinais do meio ambiente (Figueiredo, 2000).

### 2.3.1.2 *Pseudomonas fragi*

A temperatura ótima de crescimento para este microrganismo gira em torno de 26°C. Ele também participa ativamente do processo de adesão e formação de biofilme. Possui a capacidade de se aderir em superfícies de aço inoxidável, bem como vidro, poliestireno, teflon e outros, devido à produção de filamentos polissacarídicos. Uma vez aderida, a sua remoção pelos tradicionais métodos de limpeza e sanitização pode ser dificultada. Estudos têm demonstrado que na adesão em aço inoxidável, em fluxo contínuo de leite, *P. fragi* produz fimbria em 30 minutos, a 25°C e em 2 horas, a 4°C (Arcuri, 2000). Outros

trabalhos relatados por Zottola & Sasahara (1994) mostraram que, a 23°C por 24h, este microrganismo apresentou crescimento em superfície de aço inoxidável com fendas, sugerindo possível formação de biofilme.

É interessante mencionar ainda a colonização de *P. fragi* em carne. Segundo Zottola & Sasahara (1994), este microrganismo presente em alguns tipos de carne aderiu às fibras do colágeno da carne crua. Nesta mesma pesquisa, foi demonstrado que as células aderidas ao músculo da carne podiam ser transferidas para a superfície de aço inoxidável limpa contaminando-a. Em outro trabalho, foram estudadas a adesão e a formação de biofilme em superfície de vidro e aço inoxidável por *P. fragi* e *L. monocytogenes* e observou que, quando estas bactérias crescem juntas, há a formação de biofilme mais complexo e maior do que se o crescimento fosse apenas de um microrganismo. *Pseudomonas fragi* é o organismo predominante e colonizador primário, visto que as células de *L. monocytogenes* são envolvidas pela matriz estabelecida por *P. fragi* (Zottola Sasahara, 1994).

Alguns compostos com capacidade para fazer ligação ou quebrar moléculas de carboidratos diminuem a adesão de *P. fragi* em superfície de aço inoxidável, segundo algumas pesquisas relatadas por Hood & Zottola (1995). Entretanto, compostos específicos de proteínas tendem a causar pequeno efeito no processo de adesão.

### 2.3.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Este microrganismo é ubíquo, de vida livre e capaz de sobreviver em ambientes hostis. Também forma biofilme em diferentes superfícies de contato devido à formação do glicocálix. Esta bactéria forma alginato como maior constituinte do glicocálix (Shirtliff et al., 2002).

Devido à produção de flagelo como mediador da motilidade, *P. aeruginosa* é capaz de formar monocamada de células em superfície, após 4

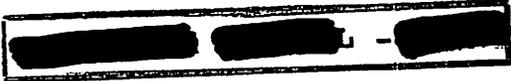
horas de contato. Em período de 5 a 8 horas, estas monocamadas tornam-se confluentes, cobrindo assim toda a superfície. É sugestivo que o flagelo é apêndice importante no processo de adesão e formação de monocamadas dispersas de células, assim como o pilli, outra estrutura que também exerce função importante na adesão de células à determinada superfície (Dalton & March, 1998; O'Toole & Kolter, 1998 citados por Figueiredo, 2000).

Alguns biofilmes, segundo Marshall (1992), citados por Figueiredo (2000), parecem ter canais na matriz polimérica permitindo a passagem de nutrientes para os níveis mais baixos. O oxigênio se difunde com muita dificuldade para as camadas mais profundas do biofilme, gerando, assim, uma zona de anaerobiose. Conseqüentemente, a atividade respiratória no biofilme é feita por bactérias capazes de utilizar nitrato ou compostos orgânicos como alternativa aos receptores de elétrons. Nessas condições de anaerobiose, as bactérias fermentativas são predominantes. Elas formam, por exemplo, dióxido de carbono e hidrogênio, que ajudam no crescimento de bactérias sulfato-redutoras e metanogênicas. Muitos dos produtos originados pela fermentação se difundem para outras zonas dentro do biofilme e são metabolizados por bactérias aeróbias.

#### **2.4 Aspectos indesejáveis e desejáveis em relação à formação de biofilmes**

Células bacterianas, como *P. aeruginosa*, aderidas a um substrato formando biofilme, são ubíquas (Shirtiliff et al., 2002).

A colonização microbiana e, conseqüentemente, o seu acúmulo sobre os equipamentos têm causado grandes problemas nas indústrias de alimentos. Biofilmes formados sobre a superfície dos equipamentos podem diminuir a transferência de calor em trocadores de calor acompanhado do aumento no custo. Sérios problemas também ocorrem quando microrganismos corroem determinadas superfícies causando perda de oxigênio próximo à superfície do



metal (Bower et al., 1996). Durante este processo, há uma série de reações de oxidação (anódica) e redução (catódica) de espécies químicas em contato direto com ou próximo à superfície metálica. Em soluções aeradas, a reação catódica é a redução do oxigênio, e a reação anódica é a liberação do hidrogênio. A dissolução do metal (reação anódica) diminui gradualmente com o tempo devido aos produtos da oxidação (produtos da corrosão) aderirem à superfície formando uma camada protetora que proporciona uma barreira de difusão aos reagentes. O biofilme formado sobre as superfícies de materiais metálicos pode afetar a cinética das reações catódicas e ou anódicas e pode modificar a química das camadas protetoras, acelerando ou inibindo a corrosão (Beech & Sunner, 2004). A esse processo de deterioração do metal pela atividade microbiana denomina-se biocorrosão ou corrosão influenciada por microrganismos (Arcuri, 2000).

Segundo Beech & Sunner (2004), a maioria dessas corrosões ocorre na presença de culturas puras ou mistas e sobre superfícies de ferro, alumínio, cobre, dentre outras. Os microrganismos, sejam terrestres ou aquáticos, associados à corrosão desses metais são bactérias sulfato-redutoras, redutoras/oxidantes de ferro, oxidantes de manganês e bactérias que secretam ácidos orgânicos e limo. Estes organismos formam biofilme naturalmente sobre superfícies metálicas podendo causar deterioração desse metal.

As bactérias sulfato-redutoras usam o hidrogênio gerado em meio ambiente anaeróbio, pela combinação de prótons e elétrons, que, por sua vez, aumentam a corrosão do metal. Também produzem metabólitos corrosivos, como os sulfitos, levando à incorporação de produtos de corrosão, como o sulfito de ferro dentro da matriz de biofilme (Beech & Sunner, 2004). Segundo estes mesmos autores, em superfícies de aço inoxidável, sob condições de aeração, bactérias redutoras-oxidantes de manganês fornecem produtos insolúveis, como hidróxidos e óxidos de manganês, capazes de aceitar elétrons originados da base metálica. Esta seqüência de reações produz um caminho

cineticamente favorável ao elétron vindo do anodo para o acceptor universal de elétron, o oxigênio.

Outro aspecto indesejável em relação à formação de biofilmes é o aumento da resistência a sanitizantes. As células aderidas são mais resistentes à ação de sanitizantes do que as células planctônicas devido ao desenvolvimento da resistência sobre as superfícies colonizadas. Em relação a esta resistência, os sanitizantes têm sua ação limitada pela matriz de biofilme, pela EPS e pela reação química do sanitizante com a EPS (Meyer, 2003).

A resistência aumenta gradualmente com a idade. De acordo com Bower et al. (1996), células bacterianas colonizando determinada superfície foram observadas durante sete dias e verificou-se que esta apresentou maior resistência ao sanitizante em relação à adesão de células sobre outro substrato por dois dias, sob as mesmas condições. Os resultados deste estudo sugerem possível troca fisiológica na população microbiana, assim como condições de stress dentro do biofilme. Estes fatores podem aumentar a resistência das células ao sanitizante.

Os sanitizantes utilizados na indústria, em testes laboratoriais dentro das condições indicadas pelos fabricantes, conseguem ser aprovado alcançando até 5 reduções decimais (RD) após 30 segundos de contato a 20°C com suspensões de microrganismos que são capazes de iniciar processos de adesão às superfícies (Andrade & Macêdo, 1996).

Pesquisas mostraram que microrganismos aderidos foram entre 150 e 3.000 vezes mais resistentes do que microrganismos não aderidos à ação do ácido hipocloroso, quando da ação de monoclarinas foram de 2 a 100 vezes mais resistentes (Le Chevallier et al., 1988).

Células de *L. monocytogenes* não aderidas foram eliminadas em 30 segundos de contato com o sanitizante cloreto de benzalcônio e a um sanitizante ácido/aniônico, já células aderidas resistiram ao mesmo sanitizante de 10 a 20 minutos. Outros microrganismos, como *P. fluorescens* e *Y. enterocolitica*, na

presença de sanitizantes como iodóforo e hipoclorito de sódio, sofrem redução maior ou igual a 5 RD no teste denominado de suspensão e, quando aderidos em borracha ou teflon, os sanitizantes alcançam valores próximos de, no máximo, 3,20 RD. Logo, estes microrganismos apresentaram maior resistência aos sanitizantes utilizados (Mosteller & Bishop, 1993).

Em relação aos aspectos microbiológicos, a veiculação de microrganismos alteradores ou patogênicos também é grave obstáculo enfrentado pelas indústrias de alimentos, pois gera problemas de higiene, saúde pública ou de ordem econômica (Criado, 1994).

Segundo Kumar & Anand (1998) e Macêdo (2001); nem todo biofilme causa problemas e, em ambientes naturais, a qualidade da água, muitas vezes, é mantida pela atividade metabólica das células aderidas. Os microrganismos presentes neste biofilme realizam a biodegradação de alguns compostos tóxicos e diminuem a quantidade de poluentes, tornando-se monitores de poluição. No tratamento de água potável, a remoção do nitrogênio, carbono biodegradável e precursores de trihalometanos pode ser obtida por biofilmes microbianos submersos. De acordo com Macêdo (2001), os biofilmes são a representação natural de células imobilizadas. Estes microrganismos estão presentes em bioreatores para a produção e estabilização dos processos fermentativos. As células aderidas nestes biofilmes que participam da produção de ácido acético se agregam em fragmentos de madeira e convertem vários substratos em vinagre. Esses agregados microbianos também são usados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de águas residuárias, na remoção de matéria orgânica e inorgânica.

Kumar & Anand (1998) relatam que até o trato gastrointestinal é colonizado por bactérias ácido lácticas e *Bifidobacterium* spp. constitui a maior parte da nossa microbiota indígena e funciona como camada protetora, impedindo a colonização por microrganismos patogênicos. Estes organismos, quando presentes em número suficiente, criam equilíbrio saudável entre o bom

funcionamento da microbiota normal e os possíveis danos causados a esta microbiota. Outro benefício trazido por estes microrganismos são os efeitos probióticos quando consumidos por vários alimentos fermentados.

## **2.5 Métodos para avaliar a adesão e formação de biofilmes bacterianos**

Para a detecção e enumeração de biofilmes bacterianos, os métodos utilizados são divididos em dois grupos, os métodos visuais e os não visuais.

### **2.5.1 Métodos não visuais**

Os métodos não visuais incluem a remoção de microrganismos da superfície, contagem por métodos convencionais microbiológicos (*swab*, rinsagem, raspagem, contagem padrão em placa, dentre outros) e medidas de impedância e de bioluminescência (Andrade & Brabes, 2003). Estes métodos tradicionais de análise microbiológica utilizada na avaliação da aderência bacteriana e formação de biofilmes são trabalhosos e demorados, necessitando de tempo de incubação de 24 a 72 horas, além de não detectarem a presença de resíduos que estejam nas superfícies após a higienização, podendo tornar-se poderosa fonte de contaminação dos alimentos e também aumentar a resistência aos sanitizantes (Kennedy & Oblinger, 1985; Velazques & Feirtag, 1997).

Alguns aspectos devem ser considerados na utilização dos métodos não visuais: todas as células sésseis devem ter sido removidas da superfície, a amostra não deve conter células planctônicas, os diferentes microrganismos do biofilme devem crescer nas condições de cultivo usadas e os resultados devem refletir o que ocorre no biofilme (Parizzi, 1999).

### **2.5.2 Métodos visuais**

Na detecção e quantificação de biofilmes utilizando métodos visuais é muito importante mencionar que as técnicas microscópicas são as mais

recomendadas para a visualização da adesão bacteriana, crescimento e formação de biofilmes em sistemas de processamento de alimentos. Dentre os vários tipos de microscopia, incluem-se a microscopia de luz, de contraste de fase, de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (Parizzi, 1999).

Há cerca de 60 anos, a microscopia de luz foi usada por C. E. Zobbel, o primeiro pesquisador a reconhecer o papel da adesão bacteriana na formação de biofilme e corrosão de superfícies sólidas submersas no mar. Sua pesquisa mostrou a capacidade de microrganismos aderirem em lâminas de vidro que foram coradas e observadas no microscópio de luz. Na microscopia de luz usada por Zobbel é necessária a presença de superfícies transparentes, como o vidro (Parizzi, 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 ideal na quantificação de células aderidas às superfícies transparentes ou não. No momento da visualização da adesão bacteriana, são utilizadas substâncias fluorescentes, como o alaranjado de acridina para coloração direta das células, ou anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo sua observação. Com o uso do corante alaranjado de acridina, a contagem de células se dá apenas pelas bactérias viáveis, ou seja, aquelas que fluorescem de laranja (Parizzi, 1999). A microscopia eletrônica é mais indicada na avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme. A fixação das amostras é realizada utilizando agentes químicos, como glutaraldeído, paraformaldeído e o ósmio ou crio-fixadas, em que a amostra é rapidamente congelada para evitar danos às células pelos cristais de gelo (Alves, 2004).

Dentre as técnicas de microscopia eletrônica incluem-se a de varredura (MEV) e a de transmissão (MET). Um protocolo típico de preparação de

amostra para MEV envolve o desenvolvimento do biofilme sobre um suporte sólido (vidro, aço inoxidável ou borracha). A próxima etapa é a fixação da amostra, seguida de dessecação e cobertura com metal. Estes procedimentos exercem influência na qualidade da imagem resultante (Parizzi, 1999).

Na MET, após a desidratação e fixação, as amostras recebem banho de epóxi ou metacrilato, formando cobertura semelhante a plástico enrijecido. O próximo passo é cortar as amostras em ultramicrotomo, usando diamante ou lâmina de vidro de, aproximadamente, 90nm de espessura. As amostras cortadas são colocadas em grades de cobre, as quais compõem a MET. Normalmente, essas grades são revestidas com fino filme de polímero que auxilia no suporte dos cortes. Metais, como urânio ou chumbo, são utilizados para corar os cortes ultra-finos. Para finalizar, as grades são colocadas em coluna e os elétrons, transmitidos por meio da amostra, que pode ser vista fluorescente (Parizzi, 1999).

## 2.6 Controle de adesão e prevenção da formação de biofilme

Para um programa de limpeza e sanitização ser eficiente, segundo Andrade & Brabes (2003), é necessária a remoção de sujidades, de células bacterianas das superfícies dos equipamentos e, conseqüentemente, a formação de biofilme. Entretanto, limpeza inadequada pode favorecer a formação de biofilme e o aumento do potencial de biotransferência. Assim, a remoção das células microbianas é uma tarefa difícil e exige dedicação.

Estudos comparativos mostram que não há diferença significativa na higienização das superfícies em uso como aço inoxidável, vidro, náilon e compostos de polivinil enquanto novos. Todavia, com o passar do tempo, as superfícies de aço inoxidável apresentam melhores propriedades higiênicas resistindo aos danos causados pelos métodos de limpeza, como relatado por Kumar & Anand (1998). Isso porque o aço inoxidável é o principal material de

contato usado pelas indústrias de alimentos, devido à sua estabilidade a uma ampla variedade de temperaturas de processamento, além de ser fácil de higienizar e ter alta resistência à corrosão. Porém, a microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas que permitem a proteção das bactérias contra as forças exercidas pelo fluxo do fluido (Tide et al., 1999; Zottola & Sasahara, 1994).

Segundo Arcuri (2000), um biofilme microbiano presente em superfície com resíduos oriundos do alimento impede a efetiva penetração do sanitizante para eliminar os microrganismos. O sanitizante reage, inicialmente, com resíduos de proteínas, gordura, carboidratos e minerais. No final, pouca atividade biocida resta para agir sobre os microrganismos no biofilme. Tem-se conhecimento que, quando o biofilme é tratado corretamente com detergentes antes do uso dos sanitizantes, os microrganismos são geralmente eliminados. No entanto, procedimentos de limpeza incorretos não removem e nem inativam os microrganismos aderidos. Outro aspecto importante, de acordo com Kumar & Anand (1998), inclui a troca de equipamentos, materiais, acessórios e construção correta. A qualidade e as superfícies lisas dos equipamentos também são de extrema importância. Logo, segundo Arcuri (2000), na prevenção da formação de biofilme, o ideal é seguir todas as etapas de limpeza: pré-lavagem, lavagem com detergentes, enxágüe, sanitização, avaliação do processo (inspeção visual e microbiológica); seguir rigorosamente as recomendações dos fornecedores de produtos químicos: temperatura das soluções, tempo de contato, concentração, pH, taxa de turbulência, etc.; utilizar os desinfetantes recomendados pelos fornecedores, como ácido peracético ou compostos clorados; trocar gaxetas de borracha com regularidade; inspecionar e remover equipamentos cujas superfícies estejam danificadas ou corrigir o problema.

## 2.7 Procedimentos gerais de higienização nas indústrias de alimentos

A garantia, a qualidade final dos produtos e a preservação da saúde do consumidor giram em torno da realização de boas práticas de higienização, sendo muito importante no controle e prevenção de biofilmes (Akutsu, 2001).

Nas indústrias de alimentos, utensílios, equipamentos, pisos e paredes, após todas as etapas de processamento, apresentam-se carregados de resíduos, resultando em mistura rica em nutrientes que devem ser removidos das superfícies de contato antes da aplicação dos sanitizantes físicos ou químicos, uma vez que este ambiente favorece a rápida colonização e o crescimento de microrganismos. Diante disso, os princípios de higienização devem ser feitos em duas etapas: limpeza e sanitização (Giese, 1991).

A escolha do sanitizante depende do tipo de resíduo e da natureza da superfície, da qualidade da água industrial e do processo de higienização a ser utilizado. A indústria define a forma de aplicação e a concentração do detergente, o tempo e a temperatura de atuação, obedecendo às suas condições (Zottola & Sasahara, 1994).

Após a lavagem com detergentes, os equipamentos necessitam da enxaguagem para retirar resíduos suspensos do detergente.

Segundo Macêdo (2001), o monitoramento destes resíduos de detergente nas superfícies higienizadas é realizado utilizando indicadores (fenolftaleína e vermelho de metila, por exemplo) que têm a capacidade de alterar a cor em função do pH. A presença de resíduos de detergentes alcalinos pode ser detectada pela utilização do indicador fenolftaleína, que assume a coloração rosa quando o pH está acima de 8,3 e torna-se incolor quando o pH está abaixo deste valor. Em relação à presença de detergentes ácidos, a sua detecção é facilmente demonstrada pelo uso do indicador vermelho de metila, apresentando coloração amarela em pH maior que 4,4, e a cor vermelha em pH menor que este valor.

O enxágüe deve ser efetuado à temperatura mais alta, favorecendo, assim, a remoção de microrganismos e facilitando a evaporação de água das superfícies, limitando o crescimento microbiano (Andrade & Macêdo, 1996).

A desinfecção é a última etapa a ser efetuada no processo de higienização. Seu objetivo é reduzir a quantidade de microrganismos alteradores em níveis considerados seguros, nas superfícies dos equipamentos e utensílios e eliminar aqueles patogênicos. É importante lembrar que as etapas anteriores do processo de higienização reduzem a carga microbiana, mas não em níveis satisfatórios (Andrade & Brabes, 2003). É indispensável que os equipamentos a serem sanitizados estejam previamente limpos de forma eficiente, pois resíduos alimentares e incrustações minerais protegem os microrganismos da ação do sanitizante (Arcuri, 2000).

A desinfecção, realizada de forma correta, visa à prevenção de contaminações futuras sobre os equipamentos e aumenta a vida de prateleira dos alimentos (Andrade & Macêdo, 1996). As etapas de pré-lavagem e lavagem utilizando detergentes devem ser efetuadas logo após o uso dos equipamentos e a sanitização antes da utilização dos mesmos. Este procedimento é de extrema importância, pois, após a lavagem e o enxágüe, os equipamentos ficam expostos e à espera da próxima utilização. Durante este período de tempo, microrganismos aderidos à superfície ou que venham a contaminá-la, podem desenvolver-se (Giese, 1991).

## **2.8 Sanitizantes**

Células bacterianas aderidas à superfície de contato de alimentos representam grande perigo pois podem contaminar o alimento. A sanitização das superfícies dos equipamentos utilizados é um dos métodos para prevenir a contaminação. Há evidências de que a prática corrente é menos eficaz em organismos aderidos do que em células planctônicas (Hood & Zottola, 1995).

Nas indústrias de processamento de alimentos, a sanitização será eficiente se não existirem resíduos sobre as superfícies, uma vez que se têm observado aumento da resistência dos microrganismos aos sanitizantes. Isto se deve, normalmente, ao uso inadequado de detergentes para a limpeza prévia das superfícies, tempo de exposição, pH, concentração, temperatura e dureza da água (Hood & Zottola, 1995; Morton et al., 1998).

A desinfecção pode ser física, utilizando processos físicos, como o calor, na forma de vapor, água e ar quente e radiação ultravioleta ou química, utilizando agentes químicos em concentrações predeterminadas (Andrade & Brabes, 2003).

Sabe-se que a eficácia da sanitização é reduzida pela presença de matéria orgânica, pois esta serve de fonte de nutrientes e protege as bactérias da ação do sanitizante, além de poder reagir com os produtos químicos, como os compostos clorados (Hood & Zottola, 1995).

Os principais fatores vinculados à eficiência dos agentes químicos são formulação, tipos de embalagem, condições de armazenamento, resíduos contaminantes e pH (Andrade & Macêdo, 1996).

Concentrações baixas de produtos químicos são capazes de remover formas vegetativas de bactérias, mas, em contrapartida, esporos bacterianos apresentam maior resistência a esses produtos. Determinada espécie bacteriana, na forma esporulada, é cerca de  $10^5$  vezes mais resistente do que a forma vegetativa, quando submetida ao calor e  $10^2$  a  $10^4$  vezes, quando sob a ação de agentes químicos. Esta resistência das formas esporuladas pode ser vencida aumentando a concentração do sanitizante, assim como o tempo e a temperatura de contato ou ajustando o pH. É fundamental a remoção dos esporos bacterianos, pois estes, ao resistirem às diversas etapas de processamento de alimentos, podem contaminar as superfícies (Andrade & Macêdo, 1996; Macêdo, 2001).

### 2.8.1 Sanitizantes químicos

A maioria dos sanitizantes químicos usados nas indústrias de alimentos são agentes oxidantes, como hipoclorito, peróxido de hidrogênio, ozônio, ácido peracético, clorhexidina dentre outros. Estes desinfetantes devem ser seguros e exercer a função de sanitização com eficácia, além de serem de fácil manuseio e também não influenciarem na qualidade final do produto. A sua principal função é matar microrganismos aderidos à superfície, porém, atualmente, estes organismos já estão sendo encontrados nos sanitizantes ou apresentam elevada resistência a eles. Por exemplo, *Pseudomonas* sp. foi encontrada em soluções concentradas de iodo e soluções mistas de clorhexidina e quantidades elevadas de cloro livre (2,0mg/L) não foram suficientes para remover cepas de *Escherichia coli* que cresciam em biofilme (Wirtanen et al., 2001).

#### 2.8.1.1 Compostos clorados

Segundo Zottola & Sasahara (1994) e Giese (1991), os sanitizantes químicos, como os compostos clorados, são os mais utilizados nas indústrias de alimentos. Os compostos clorados podem ser inorgânicos ou orgânicos, como mostrado na Tabela 1.

Dentre os compostos clorados de origem inorgânica, o hipoclorito de sódio é o mais usado e está disponível no mercado sob a forma líquida, em teores de 1% a 10%. A vantagem de se usar os compostos clorados inorgânicos é a sua rapidez em atuação e eficiência, mas, a sua principal desvantagem está no seu alto poder de corrosão, quando usado inadequadamente (Giese, 1991). Em relação aos compostos clorados orgânicos, denominado de cloraminas orgânicas, destacando o dicloro isocianurato de sódio e o ácido tricloro isocianúrico, o seu armazenamento tem maior estabilidade, assim como em soluções aquosas, proporcionando liberação mais lenta do ácido hipocloroso, em sua forma não-dissociada, com ação antimicrobiana, conservando sua eficácia por mais tempo.

Por outro lado, as cloraminas são menos reativas com a matéria orgânica e formam menos quantidade de trihalometanos, comparando-se aos compostos clorados inorgânicos. Somente para o dióxido de cloro o seu mecanismo de ação é diferente: não se hidrolisa em solução aquosa e o agente ativo é a molécula inteira (Macêdo & Barra, 2001).

O cloro, em altas concentrações, baixos valores de pH, temperaturas elevadas ou extenso tempo de contato, pode apresentar corrosividade em diferentes superfícies como é apresentado na Tabela 2. Porém, isto pode ser evitado se as concentrações de cloro recomendadas para sanitizar determinada superfície forem corretamente utilizadas. Ao se sanitizar com cloro a superfície, é necessário que se observe o valor do pH encontra-se numa faixa de 6 a 8, se as soluções foram aplicadas à temperatura ambiente, se o tempo de contato foi mínimo, se o material utilizado não favoreceu o processo de corrosão e se a água utilizada apresentou baixos teores de sulfatos ou cloretos (Andrade & Macêdo, 1996).

Os compostos clorados de origem inorgânica, principalmente o hipoclorito de sódio e cálcio, apresentam algumas vantagens e desvantagens como mostrado na Tabela 3.

**TABELA 1** Relação dos principais compostos clorados inorgânicos e orgânicos.

<b>Compostos clorados</b>	<b>% de cloro residual total</b>
<b>Origem Inorgânica</b>	
Hipoclorito de sódio	1 – 10
Hipoclorito de cálcio	70 – 72
Hipoclorito de lítio	30 – 35
Cloro gás	100
Dióxido de cloro	17
<b>Origem Orgânica</b>	
Cloramina T	24 – 26
Dicloramina T	56 – 60
Dicloro dimetil hidantoína	66
Ácido tricloroisocianúrico	89 – 90
Ácido dicloroisocianúrico*	70

\* Disponíveis também as formas de sais de sódio e potássio

Fonte: Dychdala, 1977 citado por Macêdo, 2001.

**TABELA 2** Efeito corrosivo do cloro sobre diferentes superfícies.

<b>Superfícies</b>	<b>Concentração de cloro (CRT)</b>		
	<b>5mg/l</b>	<b>100mg/l</b>	<b>1000mg/l</b>
Vidro	nenhum	nenhum	Nenhum
Concreto, borracha mole	Nenhum	nenhum	Desintegra
Madeira	Nenhum	nenhum	Desintegra
Ferro, cobre, alumínio	Corrosivo	corrosivo	muito corrosivo
Aço inoxidável	Nenhum	corrosivo	Corrosivo

Fonte: Katsuyama e Strachan, 1980 citado por Macêdo, 2001.

**TABELA 3** Principais vantagens e desvantagens dos derivados clorados de origem inorgânica: hipoclorito de sódio e cálcio.

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Relativamente baratos	Instáveis ao armazenamento
Agem rapidamente	Inativados pela matéria orgânica
Não afetados pelos sais da água	Corrosivos quando não usados corretamente
Efetivos contra uma grande variedade de microrganismos	Irritante à pele
Efetivos em baixas concentrações	Podem provocar odores indesejáveis
Relativamente não tóxicos	Precipitam em água contendo ferro
Fáceis de preparar e aplicar em equipamentos	Menor eficiência com aumento do pH da solução
As concentrações são facilmente determinadas	Removem carbono da borracha
Podem ser usados em tratamentos de água	
Os equipamentos não necessitam ser enxaguados após a sanitização	

Fonte: adaptado de Banwart, 1989.

### 2.8.1.2 Peróxido de hidrogênio

Macêdo (2001) descreve o peróxido de hidrogênio como sendo um sanitizante muito utilizado na indústria de alimento há décadas, exercendo a função de bactericida e esporicida em razão da liberação do oxigênio. Sua aplicação se dá na esterilização de embalagens de produtos assepticamente embalados e na sanitização de superfícies e utensílios. A ação do peróxido de hidrogênio como sanitizante apresenta algumas vantagens e desvantagens que estão apresentadas na Tabela 4.

Em virtude das soluções de peróxido de hidrogênio apresentarem-se instáveis, é necessário que os produtos comerciais apresentem, em sua

**TABELA 4** Vantagens e desvantagens do peróxido de hidrogênio como sanitizante.

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Baixa toxicidade	Corrosivo a cobre, zinco e bronze
Baixo efeito residual	Longo tempo de contato para baixas temperaturas
Não requer enxágüe	Precaução no manuseio e dosagem
	Controle do oxigênio ativo na utilização

Fonte: adaptado de Microrganismos, sd citado por Macêdo, 2001.

composição, substâncias orgânicas estabilizantes, como acetanilida, uréia e ácido úrico. Somente a uréia não consome permanganato. Se o único princípio ativo do sanitizante for o peróxido, o método iodométrico é o mais indicado, mas se associado ao ácido peracético, por exemplo, o peróxido de hidrogênio é determinado com titulação com permanganato de potássio. É de extrema importância que se informe da presença de acetanilida e ácido úrico na composição do sanitizante (Andrade & Macêdo, 1996; Macêdo, 2001).

O peróxido de hidrogênio, na indústria de alimentos, deve ser usado na concentração de 0,3% a 30%; pH igual a 4,0, em que sua eficiência é relevante; temperatura ambiente até 80°C e tempo de contato entre 5 a 20 minutos. Segundo Andrade & Macêdo (1996), a atuação deste sanitizante em altas temperaturas é eficaz na remoção de esporos devido à sua estabilidade. Por exemplo, temperaturas de até 95°C têm sido utilizadas na esterilização de embalagens ou tratamento com peróxido seguido de ar quente a 125°C. Este sanitizante é volátil quando submetido ao ar quente, colaborando para que o limite residual de 0,1mg/l de peróxido no alimento não seja ultrapassado, conforme a legislação em vigor.

O peróxido, embora seja um forte agente oxidante, é capaz de produzir radicais hidroxilas sob radiação UV. Alguns sais inorgânicos, como sais de

cobre, contribuem para o aumento da atividade bactericida e esporicida deste sanitizante (Andrade & Macêdo, 1996).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKUTSU, C. K. Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado. 2001. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula.** Porto Alegre: Artmed, 1999. 759 p.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura.** Lavras: UFLA, 2004. 43 p.
- ANDRADE, N. J.; BRABES, K. C. S. Procedimentos de higienização e biofilmes microbianos na indústria de alimentos. In: MENDONÇA, R. C. S.; BRABES, K. C. S.; OLIVEIRA, K. A. M.; VIEIRA, E. N. R. (Ed.) **Microbiologia de alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo.** Viçosa, 2003. p. 145-160.
- ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1996. 182 p.
- ARCURI, E. F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 9, n. 53, p. 40-45, jul./ago. 2000.
- BANWART, G. J. **Basica food microbiology.** New York : Van Nostrand Reinhold Company. 1989. 519 p.
- BEECH, W. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metal. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 3, p. 181-186, June 2004.
- BOWER, 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.
- CRIADO, M. T.; SUAREZ, B.; FERREROS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 2, p. 123-126, Feb. 1994.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 5, n. 13, p. 1213-1219, Nov. 2003.

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.

FLINT, S. H.; BROOKS, J. D.; BREMER, P. J. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 235-242, Mar. 2000.

GIESE, J. Sanitation: the key to food safety and public health. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 12, p. 74-80, Dec. 1991.

GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 245-248, 2003.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 3, p. 228-233, June 2002.

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 & Biodegradation**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 175-185, 2003.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 9-18, Feb. 1995.

KENNEDY Jr., J. E.; OBLINGER, J. L. Application of bioluminescence to rapid determination of microbial levels in ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 48, n. 4, p. 334-340, Apr. 1985.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 9-27, 1998.

LE CHEVALLIER, M. W.; CAWTHON, C. D.; LEE, R. G. Inactivation of biofilm bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 10, p. 2492-2499, Oct. 1988.

LEITE, B.; ISHIDA, M. L.; ALVES, E.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W. Genomics and X-ray microanalysis indicate that  $\text{Ca}^{2+}$  and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xilella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1-6, June 2002.

MACÊDO, J. A. B. de. **Águas & águas**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 505 p.

MACÊDO, J. A. B. de; BARRA, M. M. Derivados clorados de origem orgânica uma solução para o processo de desinfecção de laticínios e para desinfecção de água potável. In: MACÊDO, J. (Ed.) **Águas & águas**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 1-16.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, London, v. 9, n. 1, p. 34-39, Jan. 2001.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 51, n. 4, p. 249-253, 2003.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 574 p.

MORTON, L. H. G.; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARDE, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 41, n. 3/4, p. 247-259, Apr./June 1998.

MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, n. 1, p. 34-41, Jan. 1993.

PARIZZI, S. Q. F. Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas. 1998, 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SANTOS, E. de S. Microbiota do leite pasteurizado resfriado inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. 1998. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SASAHARA, K. C.; ZOTTOLA, E. A. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. **Journal Food Protection**, Ames, v. 56, n. 12, p. 1022-1028, Dec. 1993.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry? A case. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 6/7, p. 469-477, Sept./Oct. 2002.

SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. Molecular Interactions in Biofilms. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 9, n. 8, p. 859-871, Aug. 2002.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 8, n. 2, p. Feb. 1997.

STICKLER, D. Biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 2, n. 3, p. 270-275, June 1999.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, London, v. 9, n. 5, p. 222-227, May 2001.

TIDE, C.; HARKIN, S. R.; GEESEY, G. G.; BREMER, P. J.; SCHOLZ, W. The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 85-96, Nov. 1999.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2000. 827 p.

TSUNEDA, S.; AIKAWA, H.; HAYASHI, H.; YUASA, A.; HIRATA, A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, n. 2, p. 287-292, June 2003.

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

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **Internacional Journal of Food Microbiology**, London, v. 23, n. 2, p. 125-148, Oct. 1994.

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.

## CAPÍTULO 2

### AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Pseudomonas* EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL E ATUAÇÃO DE SANITIZANTES NA SUA REMOÇÃO

## RESUMO

RESENDE, Jaíne das Graças Oliveira Silva. Avaliação da formação de biofilme por *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável e atuação de sanitizantes na sua remoção. In: \_\_\_\_\_. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas* spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio. 2005. Cap. 2, p. 43 – 75. Dissertação ( Mestrado em Microbiologia Agrícola) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Este trabalho, realizado nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras, teve como objetivos avaliar a adesão e a formação de biofilme em superfície de aço inoxidável, verificar a atuação de dois sanitizantes na remoção do biofilme e observar a interação microrganismo/superfície por meio da microscopia eletrônica de varredura. Pelos resultados obtidos, constatou-se que: os cupons de aço inoxidável AISI (*International Association Stainless Steel*) 304, após submetidos à higienização padronizada, colocados em placas de Petri contendo caldo TSB com as culturas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens* e incubados por 48, 96, 144, 192 e 240 dias, lavados com tampão fosfato salino (PBS pH 7,4) para a remoção de células não aderidas e submetidas à técnica do esfregaço para enumeração das células aderidas, apresentou adesão máxima em torno de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> sobre a superfície de aço inoxidável, indicando a ocorrência de formação de biofilme, tanto para *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* quanto para *Pseudomonas fluorescens*. Verificou-se que a ação dos dois sanitizantes químicos utilizados, dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L sem correção de pH (pH 7,5) e peróxido de hidrogênio a 5% sem correção de pH (pH 5,5) foram diferentes. Os resultados mostraram que o sanitizante peróxido de hidrogênio foi mais efetivo na remoção do biofilme formado pelas células de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens*, apresentando valores acima de 3 reduções decimais (RD) que, de acordo com os valores obtidos pela APHA (3RD) para células vegetativas, foi considerado aprovado. A ação dos sanitizantes sobre células de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou valores de 3,5RD para dicloro isocianurato de sódio e 3,94RD para peróxido de hidrogênio. Em relação à remoção das células de *Pseudomonas fluorescens*, os valores obtidos foram 3,28RD para dicloro isocianurato de sódio e 3,17RD para peróxido de hidrogênio. O sanitizante dicloro isocianurato de sódio apresentou 3RD na remoção de células de *Pseudomonas fragi* e a solução de peróxido de hidrogênio, 3,39RD. A

microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou a formação de biofilme com produção de EPS sobre a superfície de aço inoxidável AISI 304 pelas células de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens* e sua remoção pelos sanitizantes, verificando-se a interação da bactéria com o substrato.

## ABSTRACT

RESENDE, Jaíne das Graças Oliveira Silva Resende. Formation of biofilm by *Pseudomonas* on stainless steel surface and the actuation of sanitizers in your remove. In: \_\_\_\_\_. **Formation of biofilm on stainless steel by *Pseudomonas* spp. and its control by hydrogen peroxide and sodium isocyanurate diclorous.** 2005. Chap. 2, p. 43 - 75. Dissertation ( Master in Agricultural Microbiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.

This essay, accomplished at the Food Microbiology, Eletron Microscopy and the Ultra-Structural Analysis laboratories (LME) of the Federal University of Lavras, aimed to estimate the formation and adherence of biofilm on stainless steel surface, verify the actuation of two sanitizers on the removal of biofilm and investigate the microorganism/surface interaction by means of scanning electron microscopy. From the obtained results, it was verified that: the stainless steel coupons AISI (*International Association Stainless Steel*) 304, after being submitted to standard hygienics procedures, put on Petri dishes with TSB liquid with bacterial cultures of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* and *Pseudomonas fluorescens* and incubated for 48, 96, 144, 192 e 240 days, washed in phosphate saline buffer (PBS pH 7,4) to remove the non-adhered cells which had been subjected to the scrubbing techniques to enumerate the adhered cells, have shown maximum of adherence, something around  $10^6$  to  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> on the stainless steel surface, thus indicating the occurrence of formation of biofilm, as for *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* and as for *Pseudomonas fluorescens*. It was also noted that, the performance of the two chemical sanitizers used, sodium isocyanurate diclorous at 100mg/L without correction of pH (pH 7,5) and hydrogen peroxide at 5% without correction of pH (pH 5,5) were different. The results showed that the sanitizer hydrogen peroxide was more effective on the removal of biofilm formed by the *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* and *Pseudomonas fluorescens* cells, showing values over 3 decimal reductions (RD), that, according to the values suggested by APHA (3 RD) to vegetative cells, was considered approved. The action of the sanitizers on cells of *Pseudomonas aeruginosa* showed values of 3,5RD for sodium isocyanurate diclorous and 3,94RD for hydrogen peroxide. As to the removal of *Pseudomonas fluorescens* cells, the obtained values were 3,28RD for sodium isocyanurate diclorous and 3,17RD for hydrogen peroxide. The sanitizer sodium isocyanurate diclorous showed 3RD on the removal of *Pseudomonas fragi* cells and the solution of hydrogen peroxide, 3,39RD. The scanning electronic microscopy (MEV) or (SEM) showed the formation of biofilm with

production of SPE on the stainless steel surface AISI 304 by the *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* and *Pseudomonas fluorescens* and their removal by the sanitizers, thus checking the interaction of the bacterium with the substratum.

## 1 INTRODUÇÃO

A adesão bacteriana e a formação de biofilme em superfície de processamento de alimentos são grandes problema. Biofilme é uma camada de microrganismos que adere a vários tipos de superfície, como aço inoxidável, teflon, borracha, vidro e poliestireno, dentre outras.

Na indústria de alimentos, a superfície de contato mais utilizada nas etapas de processamento de alimentos é a de aço inoxidável, por ser estável a várias temperaturas, fácil de higienizar e resistente à corrosão. Porém, se não houver procedimentos de limpeza e desinfecção imediatamente após o uso do equipamento, pode ocorrer a formação de biofilme e sua remoção torna-se mais difícil, dificultando o procedimento de higienização, principalmente porque células aderidas são mais resistentes à ação dos sanitizantes (físicos e químicos) do que as células planctônicas. Os processos de adesão, quando não devidamente controlados, podem ser importante fonte de contaminação.

Ao se usar sanitizante à base de cloro, sua eficiência depende da concentração de ácido hipocloroso (HClO) presente na solução, pois este é o agente antibactericida. Quanto maior a concentração de HClO na solução, maior o seu efeito sanitizante, ou seja, maior o número de microrganismos removidos da superfície. Tanto a aderência quanto a remoção de bactérias de um substrato podem ser observados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A MEV permite a observação da interação do microrganismo com a superfície, ou seja, a presença de apêndices celulares como flagelo, fimbrias, pilli, a produção de EPS, um dos fatores que caracteriza a adesão irreversível em biofilme, bem como a microtopografia da superfície. A presença de fendas e ranhuras permite que microrganismos se alojem e iniciem a multiplicação celular, tornando mais difícil a remoção destes pela ação dos sanitizantes. A

MEV também permite a visualização da superfície após a remoção dos microrganismos pela atuação dos sanitizantes, mostrando a sua eficiência.

Enfim, uma superfície mal higienizada, acrescentada à capacidade de adesão de um microrganismo, pode se tornar fonte de contaminação e levar à formação de biofilmes. Estes, uma vez formados, são de difícil remoção, sendo importante evitá-los nos processos iniciais, antes que os microrganismos sintetizem substâncias exopolissacarídicas. A realização de um processo de higienização adequado, ou seja, que siga corretamente as normas de limpeza e sanitização determinadas, como controle da concentração das soluções, tempo e temperatura de aplicação, fluxo da solução, pode evitar a formação de biofilmes.

Diante da grande importância do controle e prevenção da formação de biofilme por vários microrganismos em diversas superfícies de contato, esta pesquisa tem como objetivos: 1 avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme em superfície de aço inoxidável por três espécies de *Pseudomonas*; 2 verificar a atuação dos sanitizantes, dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio, na remoção do biofilme; 3 observar a interação microrganismo/superfície utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local

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

química

### 2.2 Microrganismos padrões e meio de cultura

Foram utilizados microrganismos padrões durante todo o experimento. As bactérias utilizadas foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Pseudomonas fragi* ATCC 4973, adquiridos da coleção de culturas da Fundação Tropical André Tosello em Campinas, SP. A cultura estoque foi mantida sob refrigeração em óleo mineral.

### 2.3 Higienização dos cupons

Os microrganismos foram aderidos 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 durante 1h, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização os cupons foram novamente lavados com água destilada esterilizada, secos por 2h a 60°C e autoclavados a 121°C/15 minutos (Rossoni & Gaylarde, 2000).

## 2.4 Adesão das células bacterianas

### 2.4.1 Obtenção do inóculo

Foi transferida para tubos contendo caldo TSB uma alçada de cada inóculo padrão e incubada à temperatura adequada para cada espécie de *Pseudomonas* por 24h. Após a incubação, cada cultura foi centrifugada (Centrifuge 5415c - eppendorf) a 3.000 x g por 15 minutos à temperatura de 20°C-25°C e os pellets obtidos (10µL) foram ressuspensos em 200mL de caldo TSB. O número de células por mL de cada cultura foi quantificado pelo método de contagem padrão em placas (CPP) (Wirtanen, 2001, com adaptações). As culturas bacterianas foram padronizadas para cerca de 10<sup>5</sup> células/mL. Após a padronização, 20 cupons para cada inóculo foram imersos em 60mL de caldo TSB; 10mL das culturas bacterianas, contidas em placas de petri, foram incubadas, sob agitação branda, a 30°C, 26°C e 37°C para *P. fluorescens*, *P. fragi* e *P. aeruginosa*, respectivamente, por 48h. Após este período, os cupons foram removidos, lavados com tampão fosfato salino estéril (PBS, pH 7,4), removendo-se assim as células não aderidas. Seguindo-se à lavagem, os cupons foram novamente imersos em caldo TSB adicionado em placas de petri. Esse procedimento foi repetido por cinco vezes, visando à formação completa de 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.

### 2.5 Enumeração das células de biofilme

Foi utilizada a técnica do esfregaço, utilizando-se *swabs* padronizados esterilizados para a remoção das células viáveis dos biofilmes, que foram enumeradas pelo método contagem padrão em placas.

### 2.5.1 Técnica do esfregaço

Para enumerar as células de biofilme após 10 dias de incubação, foram retirados dois cupons de cada placa de petri, lavados com PBS esterilizado para remover células não aderidas e o biofilme foi removido utilizando-se *swab* padronizado esterilizado. Os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% (p/v), sendo agitados em vórtex por 2 minutos. Após esse período, alíquotas de 10µL foram tomadas e o número de células viáveis foi determinado em TSA (ágar tripticase de soja), empregando-se a técnica da microgota. As placas foram incubadas a 26°C, 30°C e 37°C para *P. fragi*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente, por 24h e a contagem realizada ao final deste período conforme Joseph et al. (2001) com adaptações.

### 2.6 Sanitização

No teste de sensibilidade das células do biofilme aos sanitizantes, foram usados peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio.

#### 2.6.1 Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Antes do procedimento de sanitização, o pH (pH 5,5) e a concentração, em %, de peróxido residual livre (PRL) (Kit RQflex-Merck), do produto comercial (Vetec) foram determinados.

A partir do produto comercial, foram preparadas soluções diluídas contendo 5% de PRL, pois esta é a concentração utilizada como agente sanitizante.

Dos cupons de cada cultura bacteriana, dois contendo biofilmes foram imersos em tubos de ensaio contendo 5mL da solução durante 1 minuto a 30°C. Durante o contato do sanitizante, dentro dos tubos de ensaio, os cupons foram movimentados suavemente para melhor contato do agente químico com o biofilme. Os cupons foram transferidos para solução neutralizante de tiosulfato

de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) a 0,1M por 30s e enxaguados com PBS. Os *swabs* foram esfregados sobre uma das superfícies dos cupons e submetidos à agitação em vórtex por 2 minutos em água peptonada 0,1% (p/v). Aliquotas foram tomadas para enumeração das células retiradas, promovendo-se diluição seriada e plaqueamento em TSA, utilizando-se a técnica da microgota. As placas foram incubadas a 26°C, 30°C e 37°C para *P. fragi*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente, por 24h e os resultados expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

### 2.6.2 Dicloro isocianurato de sódio

Antes do procedimento de sanitização, o pH (pH 7,5) 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 100 mg/L de CRT, pois esta é a concentração utilizada como agente sanitizante.

Dos cupons de cada cultura bacteriana, dois contendo biofilmes foram imersos em tubos de ensaio contendo 5mL da solução durante 1 minuto à temperatura ambiente. Durante o contato com o sanitizante, dentro dos tubos de ensaio, os cupons foram movimentados suavemente para melhor contato do sanitizante com o biofilme. Os cupons foram transferidos para solução neutralizante de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) a 0,1M por 30s e enxaguados com PBS. Os *swabs* foram esfregados sobre uma das superfícies dos cupons e submetidos à agitação em vórtex por 2 minutos em água peptonada 0,1% (p/v). Aliquotas foram tomadas para a enumeração das células retiradas, promovendo-se diluição seriada e plaqueamento em TSA utilizando a técnica da microgota. As placas foram incubadas a 26°C, 30°C e 37°C para *P. fragi*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente, por 24h. Os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

## 2.7 Análise dos cupons por microscopia eletrônica de varredura

Os cupons contendo biofilme e os sanitizados com peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio, um cupom de cada cultura bacteriana, foram imersos em solução fixadora (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por um período de 15 dias. Após este período, os cupons foram lavados com tampão cacodilato por três vezes de 10 minutos, para retirar os resíduos de glutaraldeído que podem reduzir o tetróxido de ósmio, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora (mistura de volumes iguais de tetróxido de ósmio 2% (estoque) em tampão cacodilato 0,1M) à temperatura ambiente em capela de exaustão. 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% por três vezes). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) para completar a secagem, montados em *stubs* e cobertos com ouro no metalizador (Bal-Tec SCD 050). Ao final deste procedimento, os cupons foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (EVO 040 Leo) (Alves, 2004), com o objetivo de verificar a adesão e a formação de biofilme pelas células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* nos cupons de aço inoxidável e remover os microrganismos aderidos sobre os cupons, ou seja, a remoção do biofilme.

## 2.8 Eletromicrografia

Foram obtidas eletromicrografias dos microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável, antes e após o uso dos sanitizantes, usando o microscópio eletrônico de varredura EVO 040 Leo.

## 2.9 Análise estatística

O experimento foi conduzido segundo o delineamento em parcelas subdivididas com os três microrganismos (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC

15442, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525) e dois sanitizantes, dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio, realizado em três repetições. O programa estatístico utilizado para realizar a análise foi o S-PLUS.

\* A análise estatística foi feita para o estudo da formação de biofilme por *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* em superfície de aço inoxidável após 10 dias de incubação e remoção deste pela ação de dois sanitizantes, dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio. Utilizou-se o teste F para análise de variância.

Para as comparações de interesse, foi realizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Adesão de microrganismos à superfície de aço inoxidável

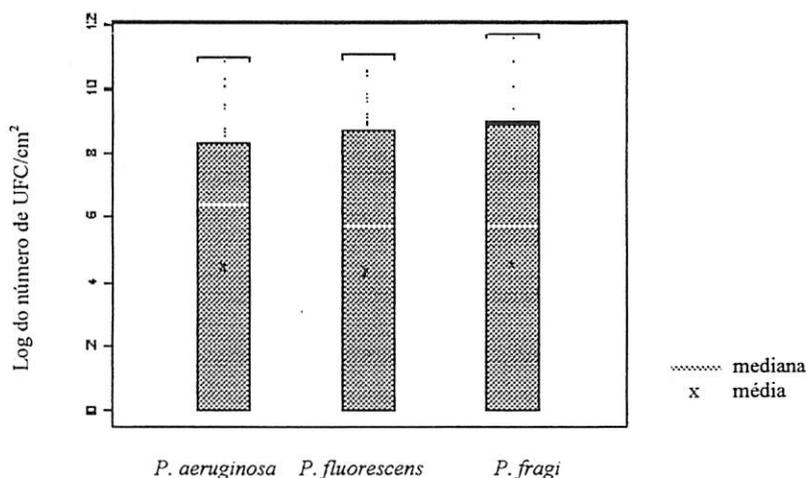
As espécies de *Pseudomonas* avaliadas formaram biofilme na superfície de aço inoxidável AISI 304, como mostrado na Tabela 1. Observa-se também que, após a sanitização com dicloro isocianurato de sódio sobre o biofilme formado por *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, houve uma redução no número de microrganismos de 3 ciclos logaritmos para as duas espécies estudadas. Em relação à *P. fragi*, a redução no número de células foi de 4 ciclos logaritmos após a sanitização com dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio. A ação do sanitizante peróxido de hidrogênio sobre as células de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* apresentaram redução de 4 e 3 ciclos logaritmos, respectivamente. Pela Figura 1 pode-se constatar que as três espécies de *Pseudomonas* apresentaram a mesma capacidade de adesão sobre a superfície de aço inoxidável. Isto pode ser observado pela mediana, que se encontra entre os valores 6 e 8 para as três espécies estudadas e que corresponde à distribuição dos dados em duas partes iguais e a média, pois os dados apresentam distribuição

**TABELA 1** Número médio de unidades formadoras de colônias (UFC/cm<sup>2</sup>) pelo método da contagem padrão em placas (CPP) antes e após a sanitização com dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio. Média de três repetições.

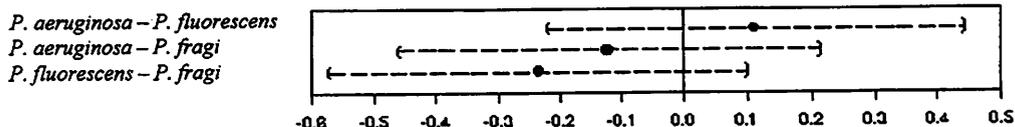
Microrganismo	Biofilme	Sanitizantes	
		Dicloro isocianurato de sódio	Peróxido de Hidrogênio
<i>P. aeruginosa</i>	$9,96 \times 10^7$	$8,96 \times 10^4$	$8,94 \times 10^3$
<i>P. fragi</i>	$1,08 \times 10^9$	$6,21 \times 10^5$	$3,92 \times 10^5$
<i>P. fluorescens</i>	$3,52 \times 10^7$	$3,53 \times 10^4$	$2,53 \times 10^4$

levemente assimétrica à direita. A análise estatística realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, apresentada na Figura 2, não apresentou diferença significativa ( $P \geq 0,05$ ) no número de UFC/cm<sup>2</sup> aderidos. As comparações realizadas entre *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *P. fragi*, *P. fluorescens* e *P. fragi* mostraram que os valores mínimos e máximos apresentados na Figura 2 interceptam o valor de referência, ou seja, zero. Por isso, não houve diferença significativa ( $P \geq 0,05$ ) entre as três espécies de bactérias aderidas.

Não houve diferença entre as espécies estudadas, pois foram utilizados o mesmo meio de cultura, rico e recomendado para o crescimento destas bactérias, e a mesma superfície (mesma rugosidade, mesmo acabamento, mesma composição e mesma microtopografia). As espécies são produtoras de exopolissacarídeo, além de apresentarem motilidade pela presença de apêndices



**FIGURA 1** Diagrama de Box-plot do logaritmo (UFC/cm<sup>2</sup>) de células aderidas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 em superfície de aço inoxidável, relacionando os três microrganismos com a sua capacidade de adesão na superfície de aço inoxidável.



**FIGURA 2** Comparações múltiplas entre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

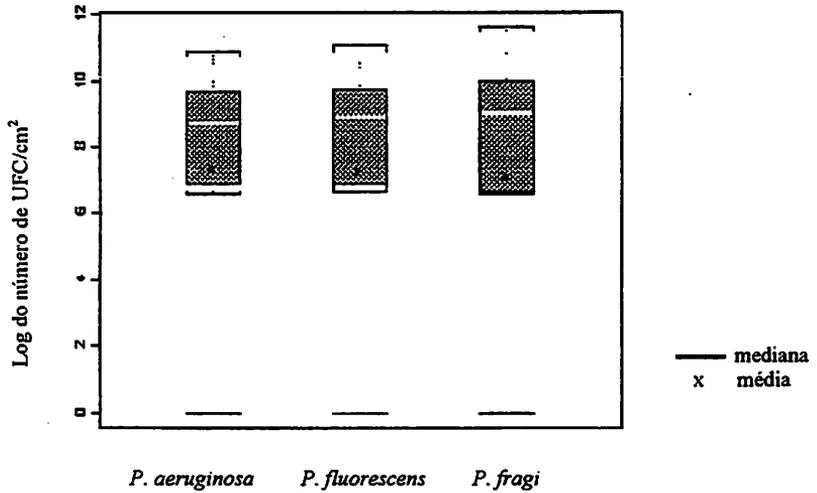
celulares, estruturas responsáveis pela adesão bacteriana.

A única variação no experimento foram as espécies de *Pseudomonas* e a temperatura de incubação ótima para cada microrganismo.

Temperaturas próximas do ideal permitiram, neste experimento, maior quantidade de células aderidas à superfície de aço inoxidável, já que são adequadas para o metabolismo do microrganismo. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou adesão à temperatura de 37°C, *P. fluorescens* aderiu a 30°C e *P. fragi* apresentou adesão máxima à temperatura de 26°C. Os resultados apresentados neste experimento são semelhantes aos encontrados por Morton et al. (1998), uma vez que a temperatura também foi um dos fatores responsáveis pela mesma capacidade de adesão de *P. fluorescens* e *P. fragi* em superfície de PVC.

### 3.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme

As contagens em  $10^6$  e  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> caracterizam a formação de biofilme bem estabelecido na superfície, como apresentado na Figura 3, que também mostra valores atípicos, ou seja, ausência de contagens que estão representados pelo valor zero. Os pontos mais altos encontrados nesta Figura representam as maiores contagens encontradas neste experimento pelo método de CPP.



**FIGURA 3** Diagrama de Box-plot do logaritmo (UFC/cm<sup>2</sup>) do número de células aderidas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 em superfície de aço inoxidável, determinado pela contagem padrão em placas, após *swab* e uso do vórtex.

Neste experimento obteve-se formação de biofilme para as células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens*, resultado este semelhante aos encontrados por Criado et al. (1994), visto que a adesão máxima encontrada foi em torno de 10<sup>6</sup> bactéria/cm<sup>2</sup>, para *Pseudomonas* sp. e 10<sup>5</sup> bactéria/cm<sup>2</sup>, para *Micrococcus* sp. A formação de biofilme pelas células de *Pseudomonas* spp. obtidas neste experimento pode ser explicada pelo fato das bactérias gram-negativas produzirem grande quantidade de EPS e possuírem flagelo. Estes fatores facilitam o processo de adesão e formação de biofilme. O meio de cultura utilizado também proporcionou o crescimento de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* em níveis elevados, assim como a temperatura de incubação, ótima para o crescimento dos microrganismos.

Neste estudo, ocorreu formação de biofilme sobre os cupons de aço inoxidável. A adesão máxima encontra-se entre  $10^6$ - $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>. Este resultado não é semelhante ao encontrado por Parizzi (1999) que, em seu trabalho, avaliou o processo de adesão por *Listeria innocua* L6a e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 sobre superfícies de aço inoxidável AISI 304, polipropileno e policarbonato. O biofilme formado sobre os cupons de prova pode ser explicado pelo tempo de exposição dos microrganismos à superfície de contato (240 horas). Encontra-se, na literatura, que o aumento do tempo de exposição da célula à superfície a ser aderida aumenta a aderência. Por isso, ficou evidenciada a formação de biofilme nos cupons de aço inoxidável.

Embora muitos trabalhos observem apenas processos de adesão, os dados obtidos neste estudo corroboram com os encontrados por Joseph et al. (2001), por encontrarem densidades populacionais de duas culturas de *Salmonella* isoladas de carne de ave, *Salmonella weltevreden* e *Salmonella* FCCM 40, ambas aderidas à superfície de aço inoxidável, com população em torno de  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> para as duas culturas. Este resultado é semelhante ao encontrado no experimento, comprovando que este fornece condições para formar biofilme. O número de microrganismos aderidos à superfície também é influenciado pela hidrofobicidade e carga superficial da superfície, pois, superfícies hidrofóbicas, como o metal, apresentam número elevado de microrganismos aderidos.

Neste experimento, após 10 dias de incubação, havia sobre a superfície de aço inoxidável a formação de biofilme por *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens*. A presença de biofilme sobre os cupons de aço inoxidável está associada à produção de EPS por estes microrganismos e também ao tempo de exposição da célula à superfície a ser aderida. Isto explica a razão do número elevado de microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável. Os resultados desta pesquisa não são semelhantes aos encontrados por Costa (1999), uma vez que este avaliou o processo de adesão em carreadores de aço inoxidável

AISI 304, n.º4 com apenas 8 horas de contato da superfície dos carregadores à cultura de *P. fluorescens*.

Os resultados desta pesquisa corroboram aos encontrados por Kumar & Anand (1998), mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável. Segundo a literatura, em pH em torno de 7 a 8, valores aplicados a este experimento para *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens*, a quantidade de células aderidas foi elevada. Sugere-se que a explicação destes resultados seja auxiliada pelo transporte ativo de cátions para a superfície, aumentando sua carga superficial, uma vez que bactérias gram-negativas apresentam carga elétrica negativa em pH neutro.

Zottola & Sasahara (1994) encontraram formação de biofilme por *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* em superfície de aço inoxidável, após 10 dias de incubação, em que a densidade populacional excedeu  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>. Estes dados são semelhantes aos encontrados no experimento, ou seja, uma população em torno de  $10^6$ - $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> formada após 10 dias de incubação. Uma cultura bacteriana de *P. aeruginosa* é capaz de aderir em aço inoxidável dentro de 30 segundos, por isso, quanto maior o tempo de contato da cultura bacteriana aos cupons de prova, maior o número de microrganismos aderidos à superfície, justificando a elevada população encontrada nos cupons de aço inoxidável. Estes dados mostram que a adesão bacteriana é importante no procedimento de higienização de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos, considerando que o número elevado de células nas superfícies dificulta a ação de detergentes e sanitizantes.

Um biofilme formado implica em procedimentos de higienização mais rígidos, uma vez que alguns sanitizantes não conseguem penetrar satisfatoriamente no glicocálix, que funciona como uma camada protetora da célula. Por isso, células sésseis são mais resistentes à ação de sanitizantes do que células planctônicas.

Numa indústria de alimentos é necessário que as superfícies onde processam-se os alimentos sejam bem higienizadas para que não veiculem microrganismos patogênicos e para que haja redução da carga microbiana de alteradores em níveis considerados seguros.

A APHA recomenda um limite máximo tolerável de microrganismos para que uma superfície esteja adequada para processar alimentos de 2 UFC/cm<sup>2</sup>, enquanto a Organização Mundial de Saúde sugere 50 UFC/cm<sup>2</sup>. Assim, como os microrganismos *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* possuem a capacidade de aderir e formar biofilme sobre a superfície de aço inoxidável, são considerados fontes de contaminação.

### **3.3 Atuação de sanitizantes na remoção de biofilme formado por *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens* em superfície de aço inoxidável**

Os sanitizantes dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio não apresentaram diferença na ação sobre as diferentes espécies de *Pseudomonas*, como apresentado na Figura 4, em que a mediana do logaritmo do número de UFC/cm<sup>2</sup> foi zero. Isso porque mais de 50% do número de microrganismos encontrados foram removidos pela ação dos sanitizantes apresentando ausência nas contagens, mostrando eficácia dos sanitizantes dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio, não apresentando diferença no logaritmo do número de microrganismos.

A comparação dos dados deste trabalho com resultados obtidos na literatura é restrita devido à especificidade das condições do experimento e dos sanitizantes usados na desinfecção dos cupons de aço inoxidável. A ação do sanitizante dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sobre as bactérias *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* aderidas à superfície de aço inoxidável, foi semelhante ao encontrado no trabalho de Rossoni & Gaylarde (2000), embora o

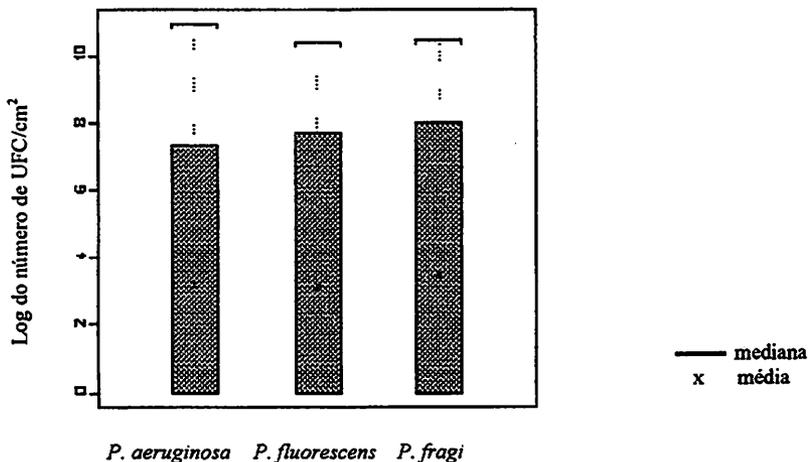


FIGURA 4 Diagrama de Box-plot do número de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 aderidas em superfície de aço inoxidável após o uso dos sanitizantes dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio.

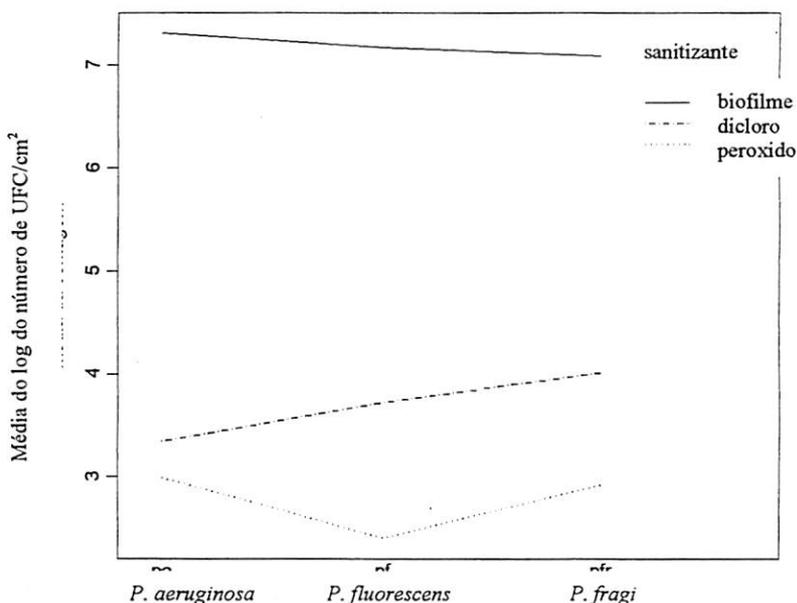
sanitizante utilizado seja o hipoclorito de sódio a 100mg/L. Estes resultados similares mostram que os dois sanitizantes são eficientes na remoção de biofilme, mas, a vantagem de se usar o dicloro isocianurato de sódio é que sua melhor atuação, segundo Macêdo & Barra (2001), está em pH que varia de 6,0 a 8,0, pH neutro e o hipoclorito é mais ativo a valores de pH que variam entre 11,0 a 12,5, que é caústico. Sugere-se, assim, o uso do dicloro isocianurato de sódio como sanitizante a escolher, além de não formar trihalometano.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com a pesquisa relatada por Joseph et al. (2001), embora o tempo de contato dos cupons ao sanitizante tenha sido diferente. No experimento, o sanitizante dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L e pH 7,5 foi colocado em ação com as células aderidas por 1 minuto, ao passo que, no trabalho de Joseph et al.(2001), o tempo

de contato foi de 5 minutos. Os resultados mostraram que, embora o tempo de contato das células ao sanitizante não tenha sido o mesmo, não houve diferença na ação deste sanitizante sobre as diferentes espécies de *Pseudomonas*. Estes resultados, embora não tenha sido mencionado o valor do pH da solução utilizado por Joseph et al. (2001), sugerem que a concentração de ácido hipocloroso na solução de dicloro isocianurato de sódio utilizado no experimento seja maior, pois, quanto maior, a sua concentração, maior a sua eficácia.

Pela análise de variância (Tabela 1A, em anexo), houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no número de reduções decimais na população dos microrganismos submetidos à ação dos sanitizantes. A Figura 5 apresenta a interação existente entre bactéria e sanitizante. O biofilme formado por *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* apresentou contagens elevadas. Após a sanitização com dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio, o número de microrganismos removidos foi significativo, como é mostrado na Figura 5.

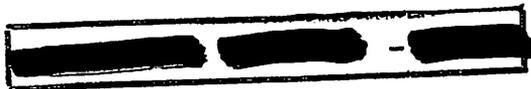
Pela Figura, o ponto na reta no qual a média do logaritmo de UFC/cm<sup>2</sup> encontra-se próxima de zero, observou-se que *P. fluorescens* apresentou interação com o sanitizante peróxido de hidrogênio, ao contrário das outras bactérias, na qual a média do logaritmo de UFC/cm<sup>2</sup> encontra-se em torno de 3. Em relação ao sanitizante dicloro isocianurato de sódio, os pontos na reta apresentam uma linearidade, indicando que a média do logaritmo de UFC/cm<sup>2</sup> para as três bactérias estudadas neste experimento encontra-se entre 3,5 - 4, mostrando não haver interação destes microrganismos com o sanitizante.



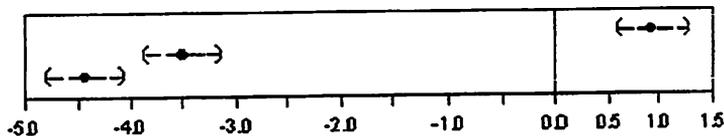
**FIGURA 5** Interação entre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 e os sanitizantes dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio.

A Tabela 3A, em anexo, apresenta o número de reduções decimais em função do microrganismo e dos sanitizantes.

Pela Figura 6, pode-se observar que, em relação ao biofilme formado pelas bactérias *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. fragi*, a solução de dicloro isocianurato de sódio reduziu um número menor de microrganismos, pois seus valores encontram-se entre -3,840 e -3,16. A solução de peróxido de hidrogênio proporcionou menor contagem de bactérias, pois, na mesma figura, seus valores



dicloro – peróxido  
 dicloro – biofilme  
 peróxido – biofilme



**FIGURA 6** Comparações múltiplas entre os sanitizantes dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio com os biofilmes formados pelas células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Pseudomonas fragi* ATCC 4973.

valores encontram-se entre -4,770 e -4,09. Portanto, quanto mais próximo do zero, que é o valor de referência, menor o número de microrganismos removidos pelos sanitizantes.

A análise estatística realizada pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, indicou que a maior taxa de remoção de bactérias ocorreu com a solução de peróxido de hidrogênio. Logo, a menor foi verificada com a solução de dicloro isocianurato de sódio.

A eficiência da solução sanitizante dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5), pode ser explicada pela concentração de ácido hipocloroso (HClO) presente nessa solução, pois este é o agente antibactericida. A eficiência do peróxido de hidrogênio a 5%, sem correção de pH (pH 5,5), pode ser explicada pela quantidade de peróxido residual livre na amostra, medida pelo RQflex plus Merck.

Pela equação de Henderson-Hasselbalch (equação 1), é possível determinar a concentração de ácido hipocloroso na solução clorada.

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

A solução de dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L e pH 7,5 (sem correção de pH) apresentou 47,71mg/L de ácido hipocloroso. A solução de peróxido de hidrogênio a 5% e pH 5,5 (sem correção de pH) apresentou 21,50mg/L de peróxido residual livre medida pelo Rqflex plus Merck. Este resultado explica a menor eficiência do dicloro isocianurato de sódio sobre as células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* aderidas aos cupons de aço inoxidável. Ficou evidenciado que o sanitizante peróxido de hidrogênio foi o mais eficiente na remoção de biofilme em superfície de aço inoxidável.

O ácido hipocloroso apresenta-se na forma não-dissociada. Por este motivo, a sua passagem pela membrana celular, que é seletiva, é mais fácil. Isto explica porque quanto maior a concentração de ácido hipocloroso, maior a sua eficácia.

A solução de peróxido de hidrogênio, em função da liberação do oxigênio, é um forte oxidante, afetando os polissacarídeos e glicoproteínas do biofilme.

A solução de peróxido de hidrogênio na concentração de 5%, pH 5,5 a 30°C, removeu um número maior de bactérias, mostrando-se mais eficiente em relação à solução de dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, pH 7,5 à temperatura ambiente como no trabalho de Wirtanen et al. (2001). Segundo este autor, a solução de peróxido na concentração de 0,5% em pH 1 a 25°C, em teste de suspensão, removeu células de *P. fragi* e *P. aeruginosa* aderidas à superfície de aço inoxidável em números superiores aos da segunda solução utilizada, hipoclorito de sódio na concentração de 0,67% em pH 13 a 25°C. Estes resultados semelhantes mostram que o peróxido de hidrogênio é mais efetivo na remoção de células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* em relação ao dicloro isocianurato de sódio, devido ao seu efeito ser baseado na produção de radicais livres, afetando os polissacarídeos e glicoproteínas da célula.

A melhor eficiência da solução de peróxido de hidrogênio, em relação à solução de dicloro isocianurato de sódio, na sanitização dos cupons de aço inoxidável apresentada neste experimento, também foi observada no trabalho desenvolvido por Jessen & Lammert (2003). Estes autores, após sanitizarem cupons de aço inoxidável numa indústria de carne com peróxido de hidrogênio e compostos clorados, nas concentrações estabelecidas pelo fabricante – não foi relatado o nome da solução clorada – na remoção de células de *L. monocytogenes*, obtiveram resultados semelhantes aos apresentados neste experimento. A contagem do número de células de *L. monocytogenes* foi menor sob a ação de peróxido de hidrogênio. A melhor ação do peróxido de hidrogênio é a quantidade de peróxido residual livre na solução afetando os polissacarídeos e glicoproteínas no biofilme.

Os resultados deste experimento corroboram com os encontrados na literatura. O sanitizante peróxido de hidrogênio reduziu um número maior de células aderidas à superfície de aço inoxidável. Resultado este semelhante aos obtidos por Carpentier & Cerf (1993).

A ação do dicloro isocianurato de sódio (pH 7,5) na remoção de células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* eliminou uma porcentagem menor de microrganismos em relação ao segundo sanitizante utilizado. Estes resultados são compatíveis à pesquisa realizada por Bloomfield & Arthur (1989), citados por Akutsu (2001). Observou-se melhor ação do sanitizante hipoclorito de sódio em comparação ao dicloro isocianurato de sódio, embora entre o hipoclorito de sódio a pH 7,4 e dicloro isocianurato de sódio a pH 7,4, a atuação do dicloro deveria ser melhor, pois sua melhor atuação está em pH entre 6,0 e 8,0.

Os resultados deste experimento apontam para a solução de peróxido de hidrogênio como sendo mais efetiva na remoção de células de *Pseudomonas* aderidas aos cupons de aço inoxidável, obtendo 3,94RD para *P. aeruginosa*, 3,17RD para *P. fluorescens* e 3,39RD para *P. fragi*, em comparação ao

sanitizante dicloro isocianurato de sódio que obteve 3,5RD para *P. aeruginosa*, 3,28RD para *P. fluorescens* e 3RD para *P. fragi*. Foi mais efetivo na remoção de células aderidas à superfície de aço inoxidável, nas condições utilizadas.

A eficiência deste sanitizante na indústria de alimento é influenciada pela ação de substâncias orgânicas, pH, temperatura, concentração e tempo de contato. A solução de peróxido de hidrogênio, para atender às necessidades da indústria, necessita estar na concentração de 0,3% a 30%, pH igual a 4,0, em que sua eficiência é relevante; temperatura ambiente até 80°C e tempo de contato entre 5 a 20 minutos (Macêdo, 2001).

O peróxido de hidrogênio é um importante agente bactericida e esporicida, em razão da liberação de oxigênio. Para agir como esporicida, o seu uso exige concentrações mais elevadas, ou seja, peróxido a 30%, pois, nesta concentração, esse agente apresenta ação esporicida mais eficaz e rápida.

A solução de peróxido de hidrogênio apresenta algumas vantagens, como baixa toxicidade, baixo efeito residual e não requer enxágüe. A sua grande importância é na esterilização de embalagens de produtos assepticamente embalados e na sanitização de superfícies e utensílios, além de ser componente de algumas formulações de sanitizantes, como o ácido peracético, tendo em sua fórmula o ácido acético e o peróxido de hidrogênio em equilíbrio (Andrade & Macêdo, 1996; Macêdo, 2001).

### **3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) destina-se basicamente ao exame de superfície das amostras. Verifica-se a interação da superfície com a bactéria e pode ser usado como técnica (semi) quantitativa. Entretanto, como relatam Hilbert et al., (2003), a quantificação é muito difícil quando os microrganismos estão agrupados ou posicionados em camadas, além do

microscópio não ser capaz de detectar ou quantificar densidades populacionais mais baixas, como, por exemplo, após procedimentos de limpeza e desinfecção.

A MEV permitiu visualizar que *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* apresentam-se sob a forma de bastonetes.

Uma das teorias propostas para explicar o mecanismo de adesão microbiana sobre determinada superfície propõe, primeiramente, o transporte de moléculas orgânicas, nutrientes e células para a superfície, formando uma camada de nutrientes sobre ela. Num segundo momento, as células bacterianas vão se aderindo à superfície com conseqüente multiplicação celular associada à síntese das EPS, deteriorando, às vezes, o alimento. Foi observado nesta pesquisa algo semelhante ao que retrata esta teoria relatada por Zottola & Sasahara (1994) em seu trabalho. A presença de grande quantidade de EPS produzida por *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* sobre os cupons de prova é indicativo de adesão bacteriana e possível formação de biofilme. Possivelmente, os microrganismos conduziram à superfície nutrientes retirados do meio de cultura, formaram uma camada destes sobre os cupons e, conseqüentemente, começaram a aderir produzindo EPS, formando biofilme e liberando bactérias da superfície.

A Figura 7A, B, C e D mostram células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* aderidas aos cupons de aço inoxidável, após crescimento em TSB a 37°C, 26°C e 30°C, respectivamente, por 10 dias de incubação, observadas pela MEV. Não foi possível observar a presença de apêndices celulares, como flagelos, nessas eletromicrografias, embora estes microrganismos tenham a capacidade de produzi-los. O comprimento destas bactérias está em torno de 1µm, tamanho este que ocupa o espaço de uma fenda localizada na superfície de aço inoxidável.

A habilidade do microrganismo para aderir na superfície de aço inoxidável depende de uma série de fatores microbiológicos, físicos, químicos e

do material, especialmente da topografia da superfície (Zottola & Sasahara, 1994; Bower et al., 1996).

A superfície é a chave para a adesão e formação de biofilme. O material mais comum utilizado nas indústrias de alimentos é o aço inoxidável, principalmente o AISI 304, # 4, que possui polimento adequado para a manipulação de alimentos.

O aço inoxidável foi utilizado por ser o principal material de contato usado pelas indústrias de alimentos, devido à sua estabilidade a uma variedade de temperaturas de processamento; também é fácil de higienizar, além de ser resistente à corrosão. A sua microtopografia é composta de ranhuras e fendas, permitindo que bactérias se alojem e iniciem sua multiplicação celular, formando assim o biofilme (Zottola & Sasahara, 1994; Tide et al., 1999; Kumar & Anand, 1998).

Pela MEV, observou-se que a topografia da superfície pode influenciar no processo de adesão e formação de biofilme. Na presença de fendas, verificou-se a adesão e possível biofilme formado (Figura 8A e B), como constatado por Verran et al. (2000), seguindo os quais, com o aumento do número de irregularidades da superfície de aço inoxidável há aumento no número de microrganismos aderidos.

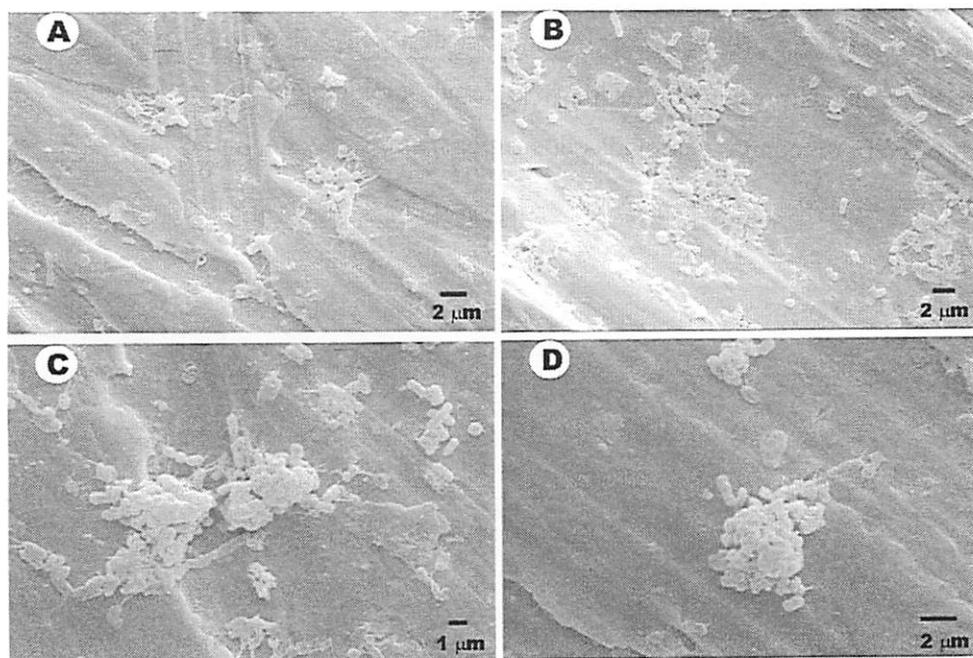
Flint et al. (2000) encontraram resultados semelhantes ao avaliarem a topografia da superfície na adesão bacteriana. Como, neste trabalho, a superfície utilizada para a adesão de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* possui ranhuras e fendas, comumente encontradas numa superfície de aço inoxidável AISI 304, ocorre a colonização bacteriana, como também foi encontrado no trabalho de Flint et al. (2000). Ficou evidenciado que a superfície, por ser semelhante, proporcionou a mesma capacidade de adesão para os três microrganismos estudados.

Resultados similares foram obtidos por Wirtanen et al. (1995), quando verificaram correlação entre formação de biofilme e rugosidade da superfície de aço inoxidável. Isto sugere que quanto mais polida a superfície, menor a capacidade de adesão bacteriana. Em virtude dos cupons utilizados apresentarem o mesmo polimento, a habilidade das bactérias *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens*, para aderir à superfície foi semelhante.

As eletromicrografias dos cupons (Figuras 9A, B, C e D e 10A e B), após a sanitização com as soluções de dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio, corroboram com a literatura, uma vez que foi observada nenhuma ou poucas células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens* aderidas sobre a superfície. Estas eletromicrografias comprovam a ação dos sanitizantes na remoção do biofilme formado por estes microrganismos. Observa-se também que o peróxido de hidrogênio foi mais efetivo na eliminação de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens*, pois a remoção do número de células aderidas aos cupons, em comparação aos cupons sanitizados com dicloro isocianurato de sódio, foi maior.

Algumas eletromicrografias mostram que os sanitizantes não removeram todas as células do biofilme localizado no interior de fendas, sendo esta mais uma evidência de que a topografia influencia na adesão e formação de biofilme (Figura 10C e D).

Isto foi constatado por Verran et al. (2000), embora Mettler & Carpenter (1999), citados por Hilbert et al. (2003), em seus estudos com formação e

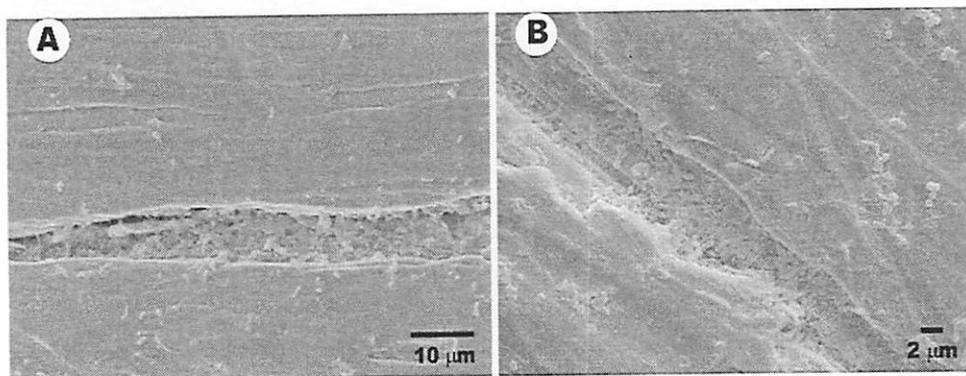


**FIGURA 7** A e B - Eletromicrografias de varredura de células de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após crescimento em TSB a 30°C, durante 10 dias; C - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após crescimento em TSB a 26°C, durante 10 dias; D - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após crescimento em TSB a 37°C, durante 10 dias.

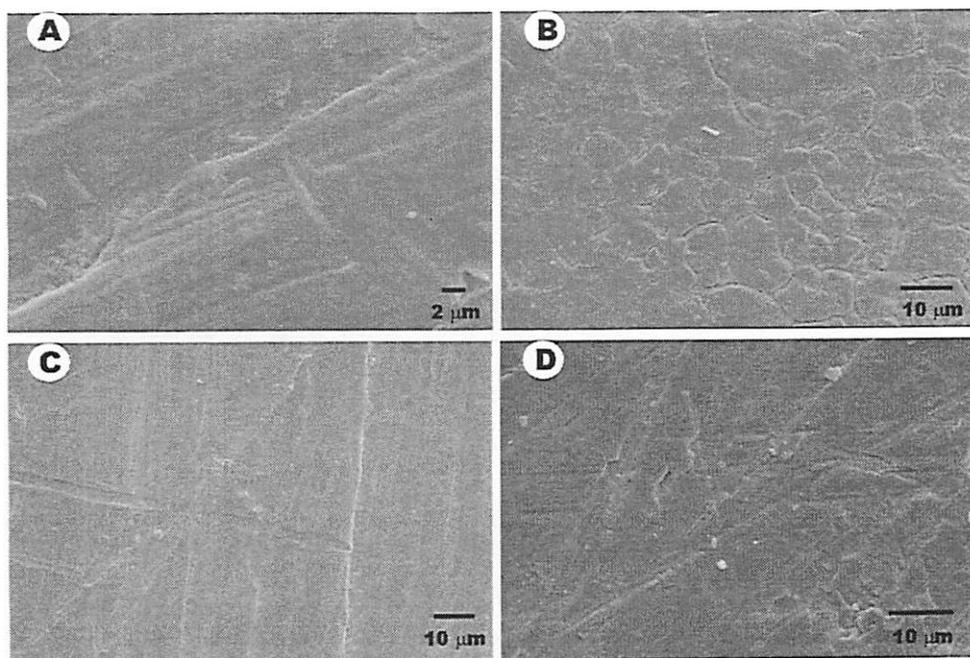
remoção de biofilme em sistema de água potável, não correlacionem formação de biofilme com topografia da superfície.

Os cupons de aço inoxidável AISI 304, utilizados neste experimento, comumente são compostos de fendas e irregularidades. A topografia da superfície altera o número de células aderidas e, conseqüentemente, sua remoção, como foi averiguada no trabalho de Percival et al. (1998), citado por

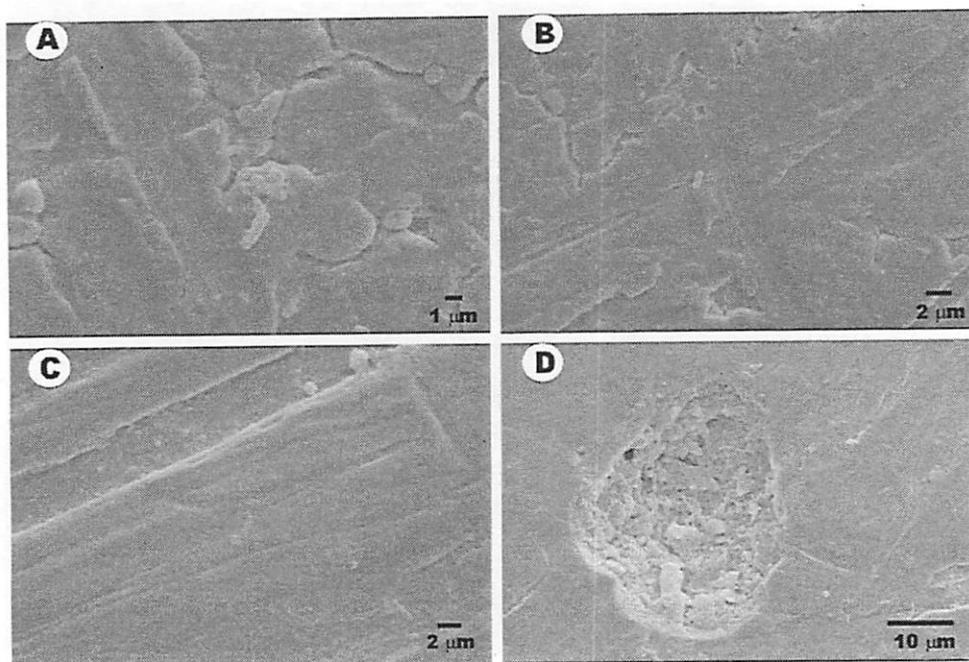
Hilbert et al. (2003). Os resultados deste trabalho mostram que as irregularidades presentes na superfície de aço inoxidável têm papel importante no número de células removidas dos cupons, apresentando contagens baixas de microrganismos.



**FIGURA 8** A - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 aderidas a aço inoxidável AISI 304 e na ranhura, após crescimento em TSB a 37°C, durante 10 dias; B - Eletromicrografia de varredura de *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 aderidas a aço inoxidável AISI 304 e na ranhura, após crescimento em TSB a 26°C, durante 10 dias.



**FIGURA 9** A - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após sanitizadas com solução de dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5); B - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após sanitizadas com solução de peróxido de hidrogênio a 5%, sem correção de pH (pH 5,5); C - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após sanitizadas com solução de peróxido de hidrogênio a 5%, sem correção de pH (pH 5,5); D - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após sanitizadas com solução de dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5).



**FIGURA 10** A - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após sanitizadas com solução de dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5); B - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 aderidas a aço inoxidável AISI 304, após sanitizadas com solução de peróxido de hidrogênio a 5%, sem correção de pH (pH 5,5); C - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 aderidas a aço inoxidável AISI 304 e na ranhura, após sanitizadas com solução de dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5); D - Eletromicrografia de varredura de células de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 aderidas a aço inoxidável AISI 304 e na ranhura, após sanitizadas com solução de dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5).

Não houve necessidade de verificar a formação de biofilme durante os 10 dias de incubação, somente ao final do último dia de incubação, uma vez que para a visualização no MEV não há a determinação de campo específico no

cupom, pois este é examinado como um todo, ou seja, toda a área é visualizada. Logo, não há como acompanhar o aumento do número de células aderidas.

Enfim, a MEV foi uma ferramenta introduzida nesta pesquisa, que trouxe contribuições marcantes ao conhecimento humano na área de biofilme ao mostrar detalhes da interação bactéria/superfície.

## 4 CONCLUSÕES

Os microrganismos selecionados para este trabalho, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *P. fragi* ATCC 4973 e *P. fluorescens* ATCC 13525, possuem grande capacidade de adesão e formação de biofilme sobre a superfície de aço inoxidável e esta habilidade é a mesma para qualquer um dos microrganismos estudados.

O sanitizante escolhido para desinfetar a superfície de aço inoxidável foi o peróxido de hidrogênio, em virtude de ser capaz de remover um número maior de células aderidas.

As eletromicrografias de MEV comprovaram a formação de biofilme com produção de EPS, pelas células de *P. aeruginosa*, *P. fragi* e *P. fluorescens*, sobre a superfície de aço inoxidável e, conseqüentemente, sua remoção dos cupons, mostrando a interação do microrganismo com a superfície e a eficiência dos sanitizantes na remoção das células aderidas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKUTSU, C. K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado.** 2001. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura.** Lavras: UFLA, 2004. 43 p.

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1996. 182 p.

BOWER, 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.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 6, p. 499-511, Dec. 1993.

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

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

FLINT, S. H.; BROOKS, J. D.; BREMER, P. J. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 235-242, Mar. 2000.

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 & Biodegradation**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 175-185, 2003.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 51, n. 4, 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.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 42, n. 1, p. 9-27, 1998.

MACÊDO, J. A. B. de. *Águas & águas*. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 505 p.

MORTON, L. H. G.; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARDE, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 41, n. 3/4, p. 247-259, Apr./June 1998.

PARIZZI, S. Q. F. *Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas*. 1998. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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.

TIDE, C.; HARKIN, S. R.; GEESEY, G. G.; BREMER, P. J.; SCHOLZ, W. The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 85-96, Nov. 1999.

VERRAN, J.; ROWE, D. L.; COLE, D.; BOYD, R. D. The use of the atomic microscope to visualize and measure wear of food contact surfaces. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 46, n. 2, p. 99-105, Sept./Oct. 2000.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **Internacional Journal of Food Microbiology**, London, v. 23, n. 2, p. 125-148, Sept./Oct. 1994.

WIRTANEN, G.; AHOLA, H.; MATTILA-SANDHOLM, T. Evaluation of cleaning procedures in elimination of biofilm from stainless steel surfaces in open process equipment. **Transactions in International Chemical Engineering**, London, v. 73, n. 1, p. 1-9, 1995.

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

## ANEXOS

	Página
<b>TABELA 1A</b> Análise de variância do logaritmo do número de microrganismos por UFC/cm <sup>2</sup> em comparação à formação de biofilme.....	83
<b>TABELA 2A</b> Médias das triplicatas do número inicial de células vegetativas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 aderidas e número de sobreviventes (nº final) após a sanitização, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de aço inoxidável.....	83
<b>TABELA 3A</b> Médias das triplicatas do número inicial de células vegetativas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 aderidas e número de sobreviventes (nº final) após a sanitização, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de aço inoxidável.....	84
<b>TABELA 4A</b> Médias das triplicatas do número inicial de células vegetativas de <i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973 aderidas e número de sobreviventes (nº final) após a sanitização, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de aço inoxidável.....	84
<b>TABELA 5A</b> Valores estabelecidos para comparações múltiplas estabelecidas entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442, <i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4793 e <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525.....	85
<b>TABELA 6A</b> Valores estabelecidos para comparações múltiplas entre os sanitizantes dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio com os biofilmes formados pelas células de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442, <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 e <i>P. fragi</i> ATCC 4973.....	85

**TABELA 1A** Análise de variância do log do número de microrganismos por UFC/cm<sup>2</sup> em comparação à formação de biofilme.

FV	GL	SQ	QM	F	5 <sub>5%</sub>
Bactéria	2	19.07	9.537	0.6199	0.5380442
Biofilme – Sanitizante	2	15576.70	7788.352	506.2363	0.0000000*
Biofilme – Bactéria – Sanitizante	4	189.24	47.311	3.0751	0.0153417*

\* Diferença significativa a 5% de probabilidade, pelo teste F.

**TABELA 2A** Médias das triplicatas do número inicial de células vegetativas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 aderidas e número de sobreviventes (nº final) após a sanitização, com respectivo número de reduções decimais (RD) no cupom de aço inoxidável

Sanitizantes	Repetição	Nº inicial	Nº final	RD
Dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5)	1	4,26 x 10 <sup>7</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>	2,5
	2	3,13 x 10 <sup>7</sup>	2,86 x 10 <sup>4</sup>	3,83
	3	2,25 x 10 <sup>8</sup>	1,03 x 10 <sup>4</sup>	4,17
Peróxido de hidrogênio a 5%, sem correção de pH (pH 5,5)	1	4,26 x 10 <sup>7</sup>	9,79 x 10 <sup>3</sup>	4
	2	3,13 x 10 <sup>7</sup>	2,22 x 10 <sup>3</sup>	4,16
	3	2,25 x 10 <sup>8</sup>	1,48 x 10 <sup>4</sup>	3,67

**TABELA 3A** Médias das triplicatas do número inicial de células vegetativas de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 aderidas e número de sobreviventes (nº final) após a sanitização, com respectivo número de reduções decimais (RD) no cupom de aço inoxidável

Sanitizantes	Repetição	Nº inicial	Nº final	RD
Dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5)	1	$2,92 \times 10^7$	$4,58 \times 10^4$	3,17
	2	$3,08 \times 10^7$	$1,49 \times 10^4$	3,5
	3	$4,55 \times 10^7$	$4,56 \times 10^4$	3,17
Peróxido de hidrogênio a 5%, sem correção de pH (pH 5,5)	1	$2,92 \times 10^7$	$8,29 \times 10^3$	3,5
	2	$3,08 \times 10^7$	$3,2 \times 10^4$	3
	3	$4,55 \times 10^7$	$3,55 \times 10^4$	3

**TABELA 4A** Médias das triplicatas do número inicial de células vegetativas de *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 aderidas e número de sobreviventes (nº final) após a sanitização, com respectivo número de reduções decimais (RD) no cupom de aço inoxidável

Sanitizantes	Repetição	Nº inicial	Nº final	RD
Dicloro isocianurato de sódio a 100mg/L, sem correção de pH (pH 7,5)	1	$5,66 \times 10^7$	$3,0 \times 10^4$	3,17
	2	$7,55 \times 10^8$	$1,42 \times 10^6$	2,33
	3	$2,42 \times 10^9$	$4,12 \times 10^5$	3,5
Peróxido de hidrogênio a 5%, sem correção de pH (pH 5,5)	1	$5,66 \times 10^7$	$5,92 \times 10^3$	4,17
	2	$7,55 \times 10^8$	$3,66 \times 10^5$	2,5
	3	$2,42 \times 10^9$	$8,73 \times 10^5$	3,5

**TABELA 5A** Valores estabelecidos para comparações múltiplas estabelecidas entre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fragi* ATCC 4793 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525

Microrganismos	Estimativa	Estimativa de erro	Valores inferiores	Valores superiores
<i>P. aeruginosa</i> - <i>P. fluorescens</i>	0,113	0,142	-0,219	0,446
<i>P. aeruginosa</i> - <i>P. fragi</i>	-0,122	0,143	-0,458	0,215
<i>P. fluorescens</i> - <i>P. fragi</i>	-0,235	0,143	-0,570	0,100

**TABELA 6A** Valores estabelecidos para comparações múltiplas entre os sanitizantes dicloro isocianurato de sódio e peróxido de hidrogênio com os biofilmes formados pelas células de *P. aeruginosa* ATCC 15442, *P. fluorescens* ATCC 13525 e *P. fragi* ATCC 4973.

Sanitizantes	Estimativa	Estimativa de erro	Valores inferiores	Valores superiores
Dicloro isocianurato de sódio-peróxido de hidrogênio	0,925	0,138	0,602	1,25
Dicloro isocianurato de sódio-biofilme	-3,500	0,145	-3,840	-3,16
Peróxido de hidrogênio-biofilme	-4,430	0,145	-4,770	-4,09