

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR
Staphylococcus aureus NA SUPERFÍCIE DE
AÇO INOXIDÁVEL E VIDRO E SUA
RESISTÊNCIA A SANIFICANTES QUÍMICOS**

SIMONE CRISTINA MARQUES

2005

59226
050394

SIMONE CRISTINA MARQUES

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR
Staphylococcus aureus NA SUPERFÍCIE DE AÇO
INOXIDÁVEL E VIDRO E SUA RESISTÊNCIA A
SANIFICANTES QUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”

**Orientadora
Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli**

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2005**

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

Marques, Simone Cristina

Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos / Simone Cristina Marques. —Lavras : UFLA, 2005.

64 p. : il.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Estafilococo. 2. Biofilme. 3. superfície. 4. Sanificante químico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

SIMONE CRISTINA MARQUES

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Staphylococcus aureus* NA
SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL E VIDRO E SUA RESISTÊNCIA
A SANIFICANTESQUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de Pós
Graduação Stricto Sensu em Ciência dos Alimentos,
para a obtenção do título de “Mestre”

APROVADA em 16 de fevereiro de 2005

Profo. Dr. Eduardo Alves UFLA

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo UFLA

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL**

Aos meus pais, Vera e José Santana, pelo amor incondicional, respeito e confiança. Às minhas queridas irmãs, Patrícia, Cláudia, Raquel e Danielle; aos anjinhos da minha vida Gabriella, Rafaella e João Vitor. Aos meus amigos, fonte de estímulo para superar as barreiras da vida.
A Deus, pelo dom de perseverar em meus sonhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida.

À minha amiga e orientadora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela confiança, apoio e incentivo constantes em minha formação científica e como ser humano. Agradeço pela realização deste sonho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro na realização deste projeto.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras auxílio no desenvolvimento desta pesquisa

A Ecolab, pela cooperação com a doação do sanificante.

À minha adorável mãe e querido pai, por serem a luz da minha vida. Por simplesmente serem tudo que preciso para ser feliz e correr atrás de meus sonhos.

Às minhas irmãs, Patrícia, por iniciar a vida acadêmica na família; Cláudia, fonte de alegria e estímulo; Raquel, pelos puxões de orelha e Danielle, que me segue nesta árdua microbiologia.

Aos meus anjinhos, Gabriella, Rafaella e João Vitor, pelo lindo sorriso e carinho que fazem minha vida se tornar mais bela.

À minha amiga Cristiane que, com seu exemplo de perseverança, faz minha batalha se tornar pequena.

À Viviane por todo o carinho e incentivo.

Ao Telmo, que apareceu em minha vida na hora certa e no momento exato.

Às amigas Alessandra e Jaíne, pela amizade, apoio e incentivo no desenvolvimento deste projeto. Aos seus respectivos esposos Renato e Geraldo pela amizade.

Aos colegas Alexandre e Cleube, por sempre me incentivarem nessa jornada que já dura 4 anos.

A Cleuzinha, por me dizer palavras tão iluminadas.

A amiga Bel, obrigado pela amizade e apoio no desenvolvimento dos projetos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Camila, Carolina Valeriano, Lisandra, Larissa, Lúcia, Maíra, Marina, Nélio, Rosilane e Victor.

Ao “Seu Piano”, “Seu Miguel”, Aleida e Dona Ivone, pela agradável companhia.

A Sandra, Tina, Eliane e Eloísa, pela grande ajuda e ótima convivência.

À brilhante equipe do “Biofilme”: Alessandra, Bel, Lisandra, Lúcia, Jaíne, Janete e colaboradoras como Marina e Rosilane, pela gloriosa ajuda e bate-papo na execução. Vocês sempre estarão em minhas orações de agradecimento.

Ao Prof. Nélio José de Andrade, por me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Luiz Ronaldo de Abreu e Henrique César Pereira Figueiredo, pelo incentivo e amizade.

À Rafaela, Helena e Luciana, por todos os esclarecimentos e paciência.

Ao Prof. Eduardo Alves, pela oportunidade de realização da microscopia eletrônica.

Aos meus familiares que, direta ou indiretamente, me ajudaram a alcançar este objetivo.

Ao meu anjo, minha querida vizinha que, junto a Deus, intercede pela minha felicidade.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1 Adesão microbiana e formação de biofilmes	03
2.2 Teorias de formação de biofilme.....	05
2.3 Fatores que influenciam a adesão microbiana	08
2.4 Microrganismos envolvidos no processo de adesão microbiana.....	11
2.5 Moléculas e apêndices celulares envolvidos na adesão.....	15
2.6 Tipos de superfície de contato	16
2.7 Métodos de detecção e quantificação de biofilmes	17
2.7.1 Métodos visuais	17
2.7.1.1 Técnica de ATP-bioluminescência	18
2.7.2 Métodos não visuais.....	19
2.8 Sanificantes	20
2.8.1 Sanificantes químicos.....	21
2.8.1.1 Compostos clorados.....	21
2.8.1.2 Ácido peracético.....	24
2.8.1.3 Peróxido de hidrogênio.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Microrganismo e padronização do inoculo.....	28
3.2 Suporte.....	28
3.3 Adesão de células bacterianas.....	29
3.3.1 Obtenção do inóculo.....	29
3.4 Enumeração das células no biofilmes.....	29

3.4.1 Técnica do esfregaço	29
3.5 Sanificação.....	30
3.5.1 Peróxido de hidrogênio.....	30
3.5.2 Dicloro isocianurato de sódio.....	31
3.5.3 Ácido peracético.....	31
3.6 Análise de imagem por microscopia eletrônica de varredura.....	32
3. Delineamento experimental	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Adesão bacteriana às superfícies de aço inoxidável e vidro.....	35
4.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme.....	39
4.3 Ação dos sanificantes na remoção de biofilme formado por <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e vidro.....	42
5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS.....	62

RESUMO

MARQUES, Simone Cristina **Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* ATCC na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos.** Lavras: UFLA, 2005. 64p. (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos)¹

A adesão microbiana originada pela deposição de microrganismos em superfícies, como as de aço inoxidável, vidro, poliestireno, estanho e madeira, onde as bactérias se fixam e iniciam seu crescimento, originará colônias gerando massa celular suficiente para agregar proteínas, fosfolipídeos, lipídeos, carboidratos e sais minerais formando o biofilme. Dentre os microrganismos envolvidos no processo de adesão pode-se destacar *S. aureus* por causar danos a qualidade e segurança dos alimentos. Assim, os objetivos deste trabalho foram: a) promover a adesão de *S. aureus* nas superfícies de aço inoxidável e vidro, b) avaliação da eficiência do dicloro isocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético na remoção de células de *S. aureus* das superfícies de aço e vidro e c) visualização das células aderidas de *S. aureus* nas superfícies de vidro e aço inoxidável antes e após o uso dos sanificantes. As células de *S. aureus* padronizadas para se obter 10^5 UFC/mL, foram inoculados 10 mL da cultura em placas de Petri contendo 60 mL de caldo BHI e colocados 20 cupons de aço inoxidável AISI 304 e cupons de vidro, ambos com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm, devidamente higienizados. A cada 48 horas os cupons eram removidos lavados com tampão fosfato salina e colocados novamente em placas de Petri. Testou-se a eficiência dos sanificantes químicos dicloro isocianurato de sódio a 100 mg/L, peróxido de hidrogênio a 500 mg/L e ácido peracético entre 390 mg/L a 540 mg/L de ácido peracético e 550 mg/L a 830 mg/L de peróxido de hidrogênio nas células após o período de 15 dias, as células foram então removidas com *swab* e quantificadas pela técnica da microgota em superfície de ágar Baird-Parker e os cupons seguindo um protocolo para microscopia eletrônica de varredura foram observados. Os resultados comprovaram a formação de biofilme em ambas as superfícies obtendo-se contagem na ordem de 10^7 UFC/cm². Uma contagem maior de células de *S. aureus* foi observada na superfície dos cupons de vidro. Dentre os sanificantes utilizados, o ácido peracético apresentou melhor eficiência na remoção das células aderidas nas superfícies dos cupons de aço inoxidável e vidro, demonstrando 5,26 e 4,5 RD para as células aderidas na superfície de vidro e aço inoxidável, respectivamente.

Comitê orientador: Profa. Dra. Roberta Hildorf Piccoli – UFLA.

ABSTRACT

MARQUES, Simone Cristina. **Formation of biofilms for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in the surfaces of stainless steel and glass and its resistance the chemical sanitizer.** Lavras: UFLA, 2005. 64 p. Dissertation (Master's degree in Food Science)*

The microbial adhesion caused by deposition of microorganisms on surfaces, such as stainless steel, glass, polystyrene, tin, wood, where the bacteria fix and initiate its growth, will originate colonies generating cellular mass enough to aggregate proteins, phospholipid, lipid, carbohydrates and mineral salts forming biofilms. Among the microorganisms involved in the adhesion process *S. aureus* is particularly important. Thus, the objectives of this work were: a) to verify the capacity adherence of *S. aureus* on surfaces of stainless steel and glass, b) to evaluate the efficiency of sodium dichlore isocyanurate, hydrogen peroxide and peracetic acid to detach cells of *S. aureus* from surfaces of steel and glass and c) visualize the adherence cells of *S. aureus* on surfaces of glass and stainless steel before and after the use of the sanitizers. The cells of *S. aureus* standardized to get 10^5 CFU/mL, were inoculated 10 mL of the culture into Petri dishes containing 60 mL of broth BHI. 20 coupons de stainless steel AISI 304 and coupons of glass, both with 1 mm of thickness and dimension of 10x20mm, properly hygienized were placed into dishes Petri. Every 48 hours the coupons were removed washed with salt phosphate buffer and placed in Petri dishes. Were tested the efficiency the chemical sanitizer dichlore isocyanurate of sodium of the 100 mg/L, the hydrogen peroxide of the 500 mg/L and acid peracetic enters 390 a 540 mg/L of the peracetic acid and 550 a 830 mg/L of the hydrogen peroxide after a period of 15 days on cells that were removed with swab and quantified for the technique of the microdrop in agar surface Baird Parker and coupons following a protocol for scanning electronic microscopy were observed. The results proved the formation of biofilm in both surfaces having gotten itself coating in the order of 10^7 UFC/cm². A bigger counting of *S. aureus* cell was observed in the surface of glass coupons. Among the utilized sanitizer, the peracetic acid presented better efficiency for removing cells adhered on surfaces of coupons of stainless steel and glass, demonstrating 5,26 and 4,5RD for the cells adhered in the surface of glass and stainless steel, respectively.

*Guidance Committee: Profa. Dra. Roberta Hildorf Piccoli – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A adesão microbiana é originada pela deposição de microrganismos em superfícies como as de aço inoxidável, vidro, poliestireno, estanho e madeira, onde as bactérias se fixam e iniciam seu crescimento. A adesão da bactéria a essas superfícies pode ser facilitada por apêndices celulares, como pili, flagelos e fimbrias, por facilitarem o contato entre superfície e célula. Esse crescimento celular originará colônias gerando uma massa celular suficiente para agregar proteínas, fosfolipídeos, lipídeos, carboidratos e sais minerais, debaixo da qual os microrganismos formando um cultivo puro como aqueles biofilmes formados por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes* ou uma associação possibilitando o desenvolvimento de biofilmes multi-espécies.

Os biofilmes podem ser benéficos, como para produção de vinagre e tratamento de resíduos, assim como podem ser maléficos no que concerne à corrosão de metal no qual o biofilme está localizado ou quando biofilmes formados por bactérias deterioradoras ou patogênicas podem gerar perdas para a indústria e tornar o produto potencial veiculador de doença.

Existem várias teorias propostas para a formação de biofilme, as quais baseiam-se em uma fase reversível devido à ação de forças de Van der Waals e outra fase irreversível, que envolve a adesão física da célula com a superfície por meio do glicocálix, material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzido pela bactéria e que favorece a adesão de bactérias gram-positivas e gram-negativas a superfícies.

Vários fatores, como pH, temperatura, meio de cultivo e presença de matéria orgânica, podem influenciar a adesão de microrganismo à superfície. Dentre os microrganismos envolvidos no processo de adesão, o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria gram-positiva, pode ser citado como sendo capaz de gerar

conseqüências indesejáveis à qualidade dos produtos alimentícios e danos à saúde do consumidor.

A formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* pode ser conseqüência de superfícies mal higienizadas, aliada a condições insatisfatórias de higiene pelos manipuladores, seja na manipulação da matéria-prima ou no produto final.

Existem muitos trabalhos relatando a formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e a maioria destas pesquisas promove a formação de biofilmes em condições laboratoriais.

A importância de se avaliar a formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* é dada por ele ser o principal agente causador de doenças veiculadas por alimentos em muitos países, entre eles o Brasil.

A sanificação que pode ser realizada por sanificantes físicos, como calor, água ou ar quente e radiação ultravioleta, ou por sanificantes químicos, como compostos clorados, iodóforos, quartenário de amônia e ácido peracético, entre outros.

Pelo exposto, os objetivos deste trabalho foram: a) verificar a capacidade de adesão de *Staphylococcus aureus* às superfícies de aço inoxidável e vidro, b) avaliação da eficiência do dicloro isocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético na inativação de células de *Staphylococcus aureus* das superfícies de aço e vidro e c) visualização, por meio da microscopia eletrônica de varredura, das células aderidas de *S. aureus* às superfícies de vidro e aço inoxidável antes e após o uso dos sanificantes.

2 REREFENCIAL TEÓRICO

2.1 Adesão microbiana e formação de biofilmes

A adesão microbiana ocorre devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam seu crescimento. Essa multiplicação celular dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, estabelece-se o biofilme (Zotolla & Sasahara, 1994).

Os biofilmes são constituídos de bactérias aderidas às superfícies que por sua vez, são envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos, ou seja, são depósitos onde microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálix (Criado et al., 1994).

A matriz de polímeros extracelulares de natureza polissacarídica ou protéica, também conhecida como glicocálix, expõe-se exteriormente à membrana externa das células gram-negativas e ao peptideoglicano das células gram-positivas. Ela é sintetizada por polimerases, constituindo-se em uma estrutura composta de diversas fibras de polissacarídeo ou proteínas globulares e, em seu estado hidratado contém cerca de 98% a 99% de água, protegendo, assim, as células de desidratação, já que podem reter água em quantidades muito maiores que a sua massa e se desidratam lentamente (Morton et al., 1998; Figueiredo, 2000).

O glicocálix 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 do biofilme, além de oferecer proteção às células planctônicas contra agentes antimicrobianos (Tortora et al., 2000).

Essa matriz de polímeros extracelulares contém vários grupos funcionais, incluindo grupos carboxilas, amino e fosfatos e consiste de várias substâncias orgânicas, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléidos e lipídeos. A importância dessa matriz está relacionada com o estágio inicial na formação de biofilme, devido a alterações físico-químicas que essa matriz promove na superfície celular como alterações na carga e hidrofobicidade (Tsuneda et al., 2003).

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de crosta, debaixo da qual os microrganismos continuam crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos. No biofilme, os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos, como os utilizados nos procedimentos de higienização (Mosteler & Bishop, 1993; Parizzi, 1999; Richard et al., 2003).

Os biofilmes nas indústrias de alimentos podem ser benéficos em alguns casos, como por exemplo, os existentes em biorreatores para a produção de fermentados, como o vinagre, em que bactérias que produzem ácido acético se agregam em fragmentos de madeira e convertem o substrato em produto. Agregados microbianos também são usados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de afluentes domésticos e industriais. No processo de tratamento de água potável, a remoção de nitrogênio, carbono biodegradável e precursores de trihalometanos pode ser obtida por biofilmes microbianos submersos (Parizzi, 1999; Macedo, 2001).

A presença do biofilme pode gerar condições favoráveis à corrosão do metal onde o biofilme está posicionado. Pode ocorrer corrosão localizada pela aeração diferencial que as células sofrem em função da distribuição irregular no biofilme e pela formação de sítios de anaerobiose na base do biofilme, em razão de a respiração microbiana consumir o pouco oxigênio presente. Tal situação

gera condições favoráveis para o crescimento de bactérias sulfato-redutoras que usam o hidrogênio. Este elemento é gerado em meio ambiente anaeróbio, pela combinação de prótons e elétrons que, por sua vez, aumentam a corrosão do metal. Os sulfato-redutores também produzem metabólitos corrosivos, como os sulfitos, que levam à incorporação de produtos de corrosão, como o sulfito de ferro dentro da matriz do biofilme (Zacheus et al., 2000; Beech & Sunner, 2004).

Os biofilmes formados por microrganismos patogênicos ou deteriorantes passam a ser indesejáveis em superfícies que mantêm contato com alimentos (Zotolla, 1997).

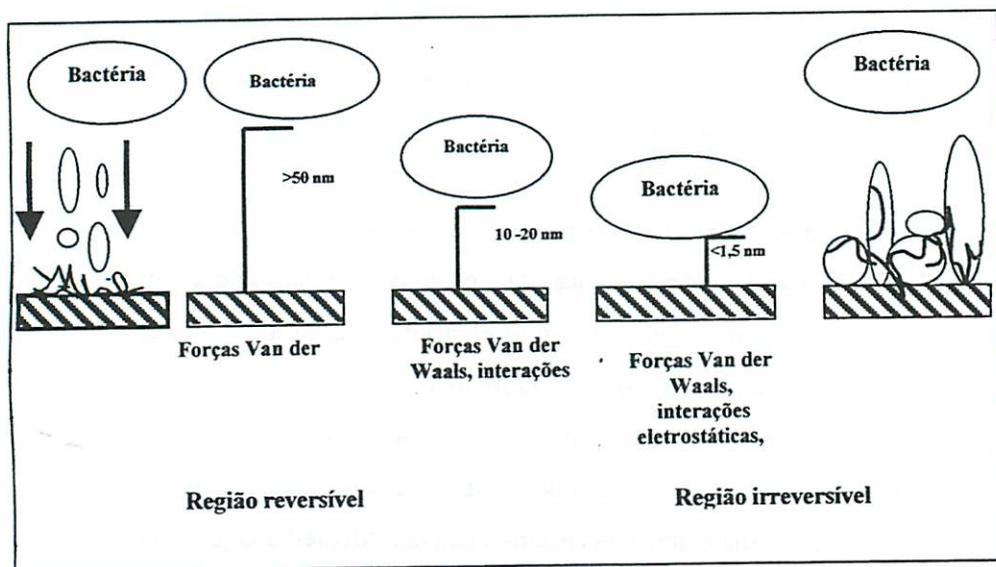
2.2 Teorias de formação de biofilme

Existem várias teorias propostas para a formação de biofilmes (Figura 1). A primeira teoria, descrita por Marshall et al., (1971), citados por Zotolla (1997), ressalta que a adesão em superfícies sólidas é um processo que acontece em duas etapas. Na primeira etapa, o processo é ainda reversível, pois o microrganismo está fracamente aderido à superfície por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática, o que promove uma fácil remoção da célula bacteriana. Na segunda etapa, o processo é irreversível, depende do tempo de aderência e envolve adesão física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzido pela bactéria, denominado matriz de glicocálix, que suporta a formação de biofilmes. O glicocálix é produzido após o processo de adesão superficial e vai fornecer condições de adesão do peptidoglicano das bactérias gram-positivas e a parte externa da membrana externa das gram-negativas (Mosteller & Bishop, 1993).

Uma segunda teoria sugere a existência de cinco etapas diferenciadas que podem ser citadas na seguinte ordem: condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; transporte de células e de nutrientes para o sítio

de aderência; processo de adesão bacteriana, ainda reversível por atração eletrostática; crescimento celular e colonização e adesão irreversível. O biofilme apresenta alta atividade metabólica, liberação de células localizadas na periferia, como demonstrado na Figura 1 (Duddridge & Pritchard, 1983, Characklis & Cooksey, 1983, Characklis, 1984 citados por Macêdo, 2001).

Uma terceira teoria proposta por Dormans et al., (1991) citados por Zotolla (1997), indica a formação do biofilme em três etapas que seria a fixação da bactéria seguida pela consolidação da bactéria na superfície e, por último, a colonização e o crescimento da bactéria na superfície. Na etapa de consolidação, ocorre a produção de material extracelular que facilita a fixação dos microrganismos. Nesta fase não se consegue retirar as células fixadas por rinsagem.



Adaptado de Busscher & Weerkamp (1987), Characklis (1984), Marshall (1971), Notermans (1994), citados por Zotolla (1997).

FIGURA 1 Representação esquemática das interações envolvidas na adesão bacteriana a um substrato sólido.

Segundo a teoria proposta por Busscher & Weerkamp (1987) o mecanismo de adesão bacteriana segue alguns passos:

Distâncias de separação maiores que 50 ηm ; 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 ηm , ocorrem interações em virtude da repulsão eletrostática, força que se opõe às forças de Van der Waals. Nesta etapa, é possível que a adesão seja reversível, porém, altera-se 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. Para isso, o filme de água precisa ser removido da interface bactéria/superfície. O maior papel da hidrofobicidade e dos componentes de superfície hidrofóbica na adesão bacteriana, provavelmente, é em razão do efeito desidratante nesse filme de água, o que possibilita a ocorrência de interações específicas de curta distância.

A uma distância menor que 1,5 ηm , 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 a uma ligação essencialmente irreversível;

A interação específica é uma interação microscópica, como a interação entre um componente da superfície da célula e o substrato ocorre a uma distância extremamente curta e permite ligações específicas iônicas, pontes de hidrogênio e outras ligações químicas. A interação não-específica é definida como aquela que ocorre em virtude da propriedade de superfície microscópica total, como as cargas ou a energia livre de superfície. Essas interações podem atuar a consideráveis distâncias do substrato. Mais recentemente, foi proposto

um valor calculado com base na força de Van der Waals, em que uma longa distância seria $> 50 \text{ nm}$, enquanto a curta seria menor que $1,5 \text{ nm}$.

Após o contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. Essas fibras se tornam mais grossas com o tempo, levando à formação da matriz do biofilme. Dentro da matriz, outras substâncias orgânicas e inorgânicas e material particulado podem existir juntamente com microrganismos. A produção de exopolissacarídeo aumenta com a adesão da bactéria à superfície. Caso as células do biofilme sejam reinoculadas no meio, como células planctônicas, haverá redução na produção de exopolissacarídeos (Kumar & Anand, 1998).

2.3 Fatores que influenciam a adesão microbiana

Vários fatores podem influenciar a adesão de microrganismos às superfícies como a fase de crescimento da célula, o tipo e propriedades do material, a presença de matéria orgânica, o pH e a temperatura do meio que envolve o microrganismo (Pompermayer & Gaylarde, 2000).

As células bacterianas possuem carga negativa e de potencial de hidrogênio (pH) em torno de 3; nas bactérias gram-positivas, a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e teurônicos da parede e dos polipeptídeos do glicocálix; nas gram-negativas, essa carga negativa é originária dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa em conjunto com os polímeros do glicocálix.

A hidrofobicidade está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa do microrganismo. Acredita-se que interações hidrofóbicas apresentam papel relevante na adesão de microrganismos, tanto em superfícies inertes para processamento de alimentos, quanto em superfícies de alimentos. Os microrganismos podem apresentar variações na hidrofobicidade,

dependendo do modo de crescimento bacteriano e das condições de cultura (Hood & Zottola, 1995).

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 pela escassez de nutrientes, mas por resposta ao stress iniciado pelo crescimento dentro do biofilme.

Tanto a bactéria quanto o substrato adquirem cargas superficiais (geralmente negativa) como resultado da adsorção de íons ou de ionização de grupos de superfície. Assim, quando a bactéria se aproxima da superfície do substrato, interações começam a se desenvolver, as quais são resultantes das cargas positivas e negativas que circundam as duas superfícies. Porém, estas cargas de superfície podem atrair íons com carga contrária, que estão presentes na fase aquosa circundante. A magnitude dessa força depende do potencial das duas superfícies, da força iônica e da constante dielétrica do meio circundante, além da distância entre a bactéria e o substrato (Denyer, 1993 citado por Figueiredo, 2000).

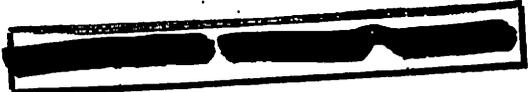
Quando as células são atraídas para a superfície do substrato, interações começam a ocorrer com produção de substâncias exopoliméricas formando ponte entre o microrganismo e o substrato, embora a produção destas substâncias extracelulares não dependam das mesmas interações eletrostáticas. (Zottola & Sasahara, 1994).

Os microrganismos, assim como algumas superfícies biológicas nas quais eles se aderem, freqüentemente têm carga negativa sob condições fisiológicas (Busscher & Weerkamp, 1987). Dessa forma, a espécie, o meio de cultura e a concentração do microrganismo podem afetar o processo de adesão (Mosteller & Bishop, 1993).

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 de variados microrganismos com várias propriedades fisiológicas e metabólicas como resposta ao pH e requerimentos nutricionais ocorrendo dentro da matriz polimérica. Pode ocorrer interdependência entre as espécies, contribuindo para o aumento da resistência a agentes antimicrobianos (Kumar & Anand, 1998; Morton et al., 1998).

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, eles podem se ligar aos cátions e proporcionar reserva desses nutrientes. A própria matriz pode funcionar como reserva de energia e carbono. Os microrganismos, normalmente, não utilizam as substâncias poliméricas que eles sintetizam, mas espécies heterogêneas dentro da matriz são capazes de degradar e utilizá-las, alterando assim a composição e estrutura do biofilme. Devido à proximidade das células microbianas na matriz do biofilme, a competitividade por nutrientes disponíveis é muito grande. Por este motivo, os agentes microbianos que entram na matriz acabam destruindo as células vizinhas (Sutherland, 2001).

A estrutura da comunidade de biofilme varia com a localização, a natureza dos microrganismos e a disponibilidade de nutrientes. 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 (Sutherland, 2001).



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 aderidas pelo seu crescimento e reprodução, contribuindo para a adesão de bactérias secundárias, detritos orgânicos, minerais, dentre outros (Beech & Sunner, 2004).

Após a etapa de crescimento, o biofilme passa pela fase de liberação de células, que ocorre de duas formas: Primeiramente, há a erosão em que o microrganismo presente no biofilme sofre contínua remoção. Em um 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 (Denyer et al., 1993, citados por Figueiredo, 2000).

2.4 Microrganismos envolvidos em processos de adesão

Um grande número de microrganismos alteradores e patogênicos é capaz de participar com maior ou menor intensidades dos processos de adesão. Dentre os alteradores estão *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* spp e *Enterococcus faecium* (Criado et al., 1994; Leriche & Carpentier, 1995; Wirtanen et al., 2001). Dentre as bactérias patogênicas incluem-se *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (Leriche & Carpentier, 1995; Parizzi, 1999; Pompermayer & Gaylarde, 2000).

Estes microrganismos participam do processo de adesão com intensidade variada e a liberação desses microrganismos poderá originar consequências indesejáveis à qualidade do alimento e fazer com que estes produtos se tornem um potencial veiculador desses patógenos.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* (do grego *Staphyle* = uva) pertencem à família *Micrococcaceae* e apresentam-se como cocos gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 μ m, imóveis, agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, produtores de catalase e normalmente beta-hemolíticos. Fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aero como em anaerobiose, diferenciando-se, assim, dos microrganismos do gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose.

Atualmente, cerca de 33 espécies de *Staphylococcus* são reconhecidas, podendo ser divididas em duas categorias: coagulase positiva e coagulase negativa. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é uma propriedade considerada como importante marcador de patogenicidade dos estafilococos (Behme et al., 1996; Trabulsi et al., 1999). Dentre estas espécies, o *Staphylococcus aureus* permanece como a mais freqüentemente associada às doenças estafilocócias, seja de origem alimentar ou não.

O crescimento para *Staphylococcus aureus* ocorre em larga faixa de temperatura, 6,5°C a 50°C, com o ótimo entre 30°C e 40°C. Quanto ao pH ele varia entre 4,0 a 10,0 sendo os valores ótimos entre 6,0 a 7,0.

Quanto a a_w , o desenvolvimento deste microrganismo está na faixa de 0,83 a 0,99, sendo considerado único em sua capacidade de crescer em valores inferiores aos considerados normais para bactérias não-halófilas. São também tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas.

Um tratamento térmico de 60°C por 12 minutos é necessário para a morte de 99,999% da população bacteriana em leite integral e cerca de 21 minutos na mesma temperatura para se obter o mesmo grau de destruição no soro (Shebuski, 1983).

A contaminação por *Staphylococcus aureus* pode resultar de fonte humana, animal ou ambiental. Em alimentos em que o processamento visa destruir este microrganismo, a presença do *Staphylococcus aureus* pode indicar contaminação pela pele, boca, fossas nasais dos manipuladores do alimento, introduzidos diretamente por lesões infectadas nas mãos e braços ou por tosse e espirros, comuns nas infecções respiratórias.

O contato com superfícies inadequadamente higienizadas dos equipamentos de produção ou exposição do produto alimentício também podem ser fonte de contaminação por *Staphylococcus aureus*. Portanto, sua presença em linhas de processamento de alimentos tem sido considerada como um indicador de condições precárias de higiene e manipulação inadequada da matéria-prima ou do produto final (Notermans & Wermans, 1991).

Dentre os principais substratos alimentícios, envolvidos epidemiologicamente como capazes de tolerar o desenvolvimento natural e artificial do *Staphylococcus aureus*, podem ser citados os produtos lácteos (queijos, leite cru, pasteurizado e em pó, manteiga e sorvetes), produtos de confeitaria (bolos recheados, tortas e doces cremosos), carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias.

No Brasil, trabalhos referentes à condição microbiológica dos queijos evidenciam que *Staphylococcus aureus* pode atingir contagens suficientemente altas para causar intoxicação alimentar. Esta situação é encontrada em vários tipos de queijos, dos quais os mais citados são o queijo minas frescal e a mussarela, com níveis de contaminação variando entre 10^2 e 10^7 UFC/g (Sabioni et al., 1994; Cerqueira et al., 1995; Rodrigues et al., 1995).

A produção das enterotoxinas é compatível com o número de células. Uma população mínima de 10^5 UFC/g de alimento é citada como necessária para produzir quantidade suficiente de enterotoxina para causar toxínose (ICMSF, 1996; Park et al., 1994; Akhtar et al., 1996).

Entende-se por toxínose estafilocócica uma doença comum entre surtos alimentares, que ocorre devido à ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas produzidas por algumas espécies de *Staphylococcus*. Os sintomas clínicos mais freqüentes são náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia sem febre, que ocorrem após 2 a 6 horas da ingestão do alimento contendo a toxina pré-formada (Betley & Harris, 1994). Podem ocorrer também dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, ainda, febres quando a quantidade de toxina for muito grande. Quando há choque e desidratação, é necessária a hospitalização para a reposição de fluidos e eletrólitos.

Os surtos de toxínose alimentares são provocados por alimentos que permaneceram no intervalo de temperatura ótima para o crescimento e produção de toxina pelo microrganismo, por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação entre outros fatores.

Em muitos países da Europa, nos Estados Unidos e no Canadá, o *Staphylococcus aureus* é o principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (Meyrand et al., 1999). Na França, a toxínose alimentar por *Staphylococcus aureus* é o segundo mais freqüente causador de surtos de doenças alimentares relacionados a produtos lácteos, depois da *Salmonella* (Rosec & Gigaud, 2002).

Recentemente, muitos casos de intoxicação alimentar estafilocócica têm ocorrido no Brasil; porém, uma investigação mais completa destes surtos, bem como sua notificação, não têm sido realizadas, o que leva à ausência de dados mais precisos.

Staphylococcus spp., em especial o *Staphylococcus aureus*, produz ampla variedade de exoproteínas que contribuem para sua capacidade de colonizar e de causar doenças em hospedeiros mamíferos e aves. Quase todas as cepas secretam enzimas e citotoxinas, as quais incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase. A

principal função destas proteínas é converter os tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários ao seu crescimento. Algumas cepas produzem uma ou mais exoproteínas adicionais, as quais incluem a toxina da síndrome do choque tóxico, as enterotoxinas estafilocócicas (SE), as toxinas esfoliativas e a leucocidina. Cada uma destas toxinas é conhecida por seus potentes efeitos nas células do sistema imune dos hospedeiros (Dinges et al., 2000).

2.5 Moléculas e apêndices celulares envolvidos na adesão

Os apêndices celulares, como fimbrias, pili e flagelos, ajudam na aderência da bactéria às superfícies, porque facilitam o contato entre superfícies e células (Hood & Zottola, 1995). Os apêndices de superfície podem servir de ponte entre a célula e o substrato de adesão, anulando a repulsão eletrostática. Esses apêndices podem variar em tamanho e rigidez, chegando a ter várias vezes o tamanho da célula. Muitos componentes de superfície da célula têm sido reconhecidos como sondas moleculares, atuando estereoquimicamente com moléculas de superfície oposta e são chamadas de adesinas (Busscher & Weerkamp, 1987).

Os apêndices contribuem para as características de superfície, assim como para a hidrofobicidade, a carga superficial, a energia livre, além do fato de muitas substâncias poderem estar associadas com a superfície da célula e afetar suas propriedades. Um bom exemplo é o composto ampifílico conhecido como ácido lipoteicóico, que é essencialmente um constituinte da membrana citoplasmática de muitas bactérias gram-positivas, porém, migra através da parede celular para o líquido do meio ambiente (Busscher & Weerkamp, 1987).

Staphylococcus aureus expressa duas proteínas associadas com a parede celular que se ligam à fibronectina (Fn) e são chamadas FnBPA e FnBPB. Os mutantes de *S. aureus* que não possuíam o gene *fnbA* ou *fnbB* foram efetivos em aderir a uma superfície, porém, o duplo mutante para *fnbA* e *fnbB*

foi completamente deficiente na adesão. Se um dos dois tipos de genes for fornecido pelos plasmídios, então, a adesão é restaurada (Dalton & March, 1998).

Proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intracelular adesina (PIA) ou poly-N-succinil- β -1,6-glucosamina, sintetizado pelo gene produto do locus *ica* do operon *icaABCD*. Os genes e produtos do locus *ica* foram demonstrados ser requeridos para formação de biofilme e virulência e são regulados em resposta a fatores ambientais, como glicose, anaerobiose, alta osmolaridade, alta temperatura, limitação de etanol ou ferro (Mader & Camper, 2002; Stanley & Lazazzera, 2004).

Locus conhecido responsável pelo quórum-sensing de *S. aureus* é o locus *agr* que consiste de 4 genes (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*). Este locus é ativado durante a transição da fase de crescimento exponencial para a fase estacionária por um mecanismo autorregulatório envolvendo um peptídeo modificado que sinaliza a densidade celular (Voung et al., 2000).

2.6 Tipos de superfície de contato

Superfícies como aço inoxidável, vidro, borracha, fôrmica, polipropileno e ferro forjado, podem contaminar ou aumentar a incidência de microrganismos, sejam alteradores ou patogênicos que, sob determinadas condições, se depositam, aderem e interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular, formando o biofilme (Zotolla & Sasahara, 1994; Parizzi, 1999; Zacheus et al., 2000; Pompermyer & Gaylarde, 2000).

O material mais freqüentemente usado para superfícies de processamento de alimentos é o aço inoxidável e o tipo AISI 304 é o mais recomendando (Tide et al., 1999). O aço inoxidável é mais resistente ao ataque de substâncias químicas por agentes oxidantes e outros agentes sanificantes

usados na indústria de alimentos, sendo assim mais resistente à corrosão e mais durável (Rassoni & Gaylarde, 2000).

2.7 Métodos de detecção e quantificação de biofilmes

2.7.1 Métodos visuais

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, pode-se citar a microscopia de contraste, microscopia de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).

A microscopia de contraste é recomendada para acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real, numa superfície transparente.

A microscopia de epifluorescência (EPF) é uma alternativa excelente na quantificação de células aderidas às superfícies. Para visualizar a adesão bacteriana, usam-se substâncias fluorescentes, como o alaranjado de acridina, para coloração direta das células, ou anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo sua observação (Costa, 1999).

Com o uso do corante alaranjado de acridina, as bactérias que são viáveis fluorescem de laranja e as que fluorescem de verde são inviáveis. Logo, no processo de contagem consideram-se apenas as células que fluorescem laranja ou laranja avermelhado. De acordo com Hobbie et al., (1977), citados por Parizzi (1999), bactérias viáveis fluorescem laranja devido à predominância do ácido ribonucleico (RNA). Enquanto as bactérias não viáveis, nas quais predomina o ácido desoxirribonucleico (DNA), fluorescem verde.

A microscopia eletrônica é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme. Este método preserva muito das estruturas associadas que se mantêm em um estado hidratado e viável. A fixação das amostras é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do

biofilme. As amostras são fixadas usando-se agentes químicos, como o glutaraldeído, o paraformaldeído e o ósmio ou crio-fixadas, e ela é rapidamente congelada para evitar danos às células pelos cristais de gelo (Zoltai et al., 1981; Zottola, 1997; Kumar & Anand, 1998; Costa, 1999).

2.7.1.1 Técnica de ATP bioluminescência

Métodos rápidos, sensíveis e precisos têm sido desenvolvidos para a enumeração de microrganismos e detecção de resíduos orgânicos, a fim de atender às necessidades das indústrias de alimentos (Kennedy & Oblinger, 1985; Hawronskyj & Holah, 1997; Geen et al., 1998). Dentre eles, encontra-se a técnica de ATP bioluminescência, que se baseia na determinação da quantidade de ATP presente sobre as superfícies avaliadas, seja ATP de origem microbiana ou não (Kennedy & Oblinger, 1985; Griffiths, 1993; Giese, 1995; Tydrich, 1996).

A técnica de ATP bioluminescência consiste em remover os resíduos da superfície, geralmente com *swab* esterilizado, colocando-os em contato com o complexo enzimático luciferina/luciferase, obtido da cauda do vagalume (*Photinus pyralis*) (Griffiths, 1993; Giese, 1995; Velazquez & Feirtag, 1997). A enzima luciferase utiliza a energia química contida na molécula de ATP para conduzir a descarboxilação oxidativa da luciferina, resultando na emissão de luz, e para cada ATP um fóton de luz é emitido (Giese, 1995; Hawronskyj & Holah, 1997). A atividade ótima ocorre em pH 7,75 e a temperaturas de 18°C-22°C (Tydrich, 1996).

Como o ATP está presente tanto em organismos vivos quanto em resíduos orgânicos e, ainda, como ATP livre, a determinação de ATP microbiano depende da eficiência da separação da bactéria do resíduo orgânico, seguida da extração e medida do ATP microbiano, ou da extração seletiva e

destruição enzimática do ATP não-microbiano, seguidas pela extração e medida do ATP microbiano (Kennedy & Oblinger, 1985; Giese, 1995; Tydrich, 1996).

A luz emitida é medida em um aparelho conhecido como luminômetro, que normalmente consiste de um fotomultiplicador e um amplificador unido a um registrador, sendo os resultados geralmente 28 expressos em unidades relativas de luz (URL) (Hawronskyj & Holah, 1997).

Esta técnica está sendo utilizada pelas indústrias de alimentos, de bebidas, como cervejarias, de laticínios, entre outros, para a detecção de bactérias contaminantes e também na avaliação do processo de higienização empregado (Kennedy & Oblinger, 1985; Griffiths, 1993; Tydrich, 1996; Velazquez & Feirtag, 1997). Contaminantes químicos, como resíduos de agentes de limpeza e sanificantes presentes nas superfícies, podem mudar a quantidade de luz emitida ou detectada, pois possuem compostos, como surfactantes, sais, corantes e íons metálicos, que podem interferir na reação enzimática (Velazquez & Feirtag, 1997; Green et al., 1998).

2.7.2 Métodos não visuais

Existem diversos métodos disponíveis para a determinação de células viáveis nas superfícies utilizadas para o processamento de alimentos. Os métodos utilizados para amostrar e enumerar biofilmes envolvem a coleta de amostras pela remoção dos microrganismos aderidos por meio de rinsagem, raspagem, *swab* ou após uso do vórtex. Em seguida, ocorre a diluição da amostra em diluente esterilizado, adição da amostra diluída em placas de Petri, adição de um meio seletivo, incubação em tempo e temperatura favoráveis ao crescimento da espécie bacteriana a ser trabalhada e após contagem do número de colônias que se formaram (Kumar & Anand, 1998)

Alguns aspectos devem ser considerados quando se trabalha com os métodos não-visuais, como: todas as células sésseis devem ser removidas da

superfície da amostra, pois ela não deve conter células planctônicas; os diferentes microrganismos do biofilme devem crescer nas condições favoráveis aos seus crescimentos e os resultados devem refletir o que acontece no biofilme (Parizzi, 1999). Outros métodos não visuais como medidas de impedância e de bioluminescência podem ser aplicados à avaliação de aderência bacteriana e formação de biofilmes.

2.8 Sanificantes

A sanificação visa eliminar microrganismos patogênicos e reduzir alteradores das superfícies de equipamentos, utensílios, manipuladores e dos ambientes até níveis considerados seguros, podendo ser realizada tanto por sanificantes físicos, como o calor, na forma de vapor, água ou ar quente, e a radiação ultravioleta, quanto por sanificantes químicos, como os compostos clorados, iodóforos, composto quartenário de amônia, ácido peracético, entre outros (Andrade & Macêdo, 1996; Rocha et al., 1999).

Esses agentes químicos caracterizam-se por apresentar níveis de eficiências variáveis em virtude das diferentes formulações, valores de pH, tipos de embalagem, condições de armazenamento e resíduos contaminantes. Caracterizam-se também por serem eficientes contra formas vegetativas de bactérias, mesmo em baixas concentrações, o mesmo não ocorrendo com esporos bacterianos. As células vegetativas são rapidamente eliminadas, na maioria das vezes, pelos sanificantes; em contrapartida os esporos são muito mais resistentes. / A forma esporulada de uma espécie bacteriana pode ser cerca de 10^5 vezes mais resistentes do que a forma vegetativa quando submetida ao calor e entre 10^2 e 10^4 vezes quando se usam agentes químicos.

O sucesso no programa de higienização das indústrias de alimentos depende da escolha correta dos agentes de limpeza e sanificação, que é baseada no tipo e grau dos resíduos aderidos às superfícies, na qualidade da água empregada, na

natureza da superfície a ser higienizada, nos tipos e níveis de contaminação microbiológica e nos métodos de higienização aplicados (Andrade & Macêdo, 1996).

2.8.1 Sanificantes químicos

A maioria dos sanificantes químicos é agente oxidante. Assim, pode ter suas atividades reduzidas por compostos inorgânicos e orgânicos presentes no meio a ser tratado. Em inativação química de microrganismos, o mais importante não é a quantidade de substância química aplicada, mas o residual desta no meio depois de a demanda ter sido suprida (Wickramanayake & Sproul, 1991).

2 No Brasil, o hipoclorito de sódio é o agente sanificante mais empregado, todavia, o ácido peracético tem certas vantagens, como a de não reagir com proteínas para produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos e ter baixo impacto ambiental.

2.8.1.1 Compostos clorados

A ação de agentes clorados resulta de uma interação oxidativa com grupos sulfídricos na parede celular ou protoplasto de certas enzimas; devido a esta atividade oxidativa do cloro, a atividade das proteínas celulares é destruída. Além disso, acredita-se que o cloro induz à irreversibilidade em reações de descarboxilação (Blomfield, 1994).

Os compostos clorados são os sanificantes mais largamente usados por possuírem custos relativamente baixos serem de fácil preparação e aplicação e eficazes para inativar bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como bolores e esporos bacterianos, e não serem afetados pela água dura. No entanto, apresentam desvantagens, como corrosão, quando usados incorretamente; são

[REDACTED]

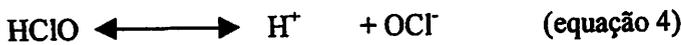
afetados pela matéria orgânica, podem provocar irritação na pele e causar alterações de sabor nos alimentos (Giese, 1991; Gava, 1998).

Vários compostos à base de cloro orgânico e inorgânico estão disponíveis no mercado. Dentre os compostos orgânicos destacam-se a cloramina T, dicloramina T, diclorodimetilhidantoína, ácido tricloroisocianúrico e o ácido dicloroisocianúrico (Andrade & Macêdo, 1996; McDonnel & Russell, 1999). Em relação aos compostos inorgânicos, podem ser destacados o cloro gás, o dióxido de cloro e os hipocloritos de sódio, de cálcio ou de lítio; dentre estes, o hipoclorito de sódio (NaClO), comercializado sob a forma líquida, em teores de 1% a 10%, é o mais usado. Os compostos clorados inorgânicos apresentam ação mais rápida e eficiente, tendo como principal desvantagem o alto poder corrosivo, quando usado incorretamente. Já os compostos clorados orgânicos, ou cloraminas orgânicas, são mais estáveis ao armazenamento e também em solução aquosa, o que implica uma liberação mais lenta do ácido hipocloroso, permanecendo efetivos por mais tempo. Estes são menos reativos com a matéria orgânica e formam menores quantidades de trihalometanos, sendo, no entanto, mais caros (Andrade & Macêdo, 1996).

Os fatores que afetam a atividade biocida dos compostos clorados, sozinhos ou em combinação, são: o pH, a concentração, a temperatura e a presença de matéria orgânica, de amônia e compostos amoniacais, de iodo ou bromo (McDonnel & Russel, 1999; Yokimi, 2001).

O mecanismo de ação dos compostos clorados orgânicos e inorgânicos, com exceção do dióxido de cloro, é semelhante: quando estão em solução aquosa, liberam ácido hipocloroso, em sua forma não-dissociada, que apresenta ação antimicrobiana (Giese, 1991; Meyer, 1994; Andrade & Macêdo, 1996; Yokimi, 2001). O dióxido de cloro não se hidrolisa em solução aquosa e o agente ativo é a molécula inteira (Andrade & Macêdo, 1996).

As hidrólises dos compostos clorados inorgânicos e das cloraminas orgânicas e a dissociação do ácido hipocloroso estão apresentadas nas equações 1, 2, 3 e 4 (Andrade & Macêdo, 1996; Yokimi, 2001).



A concentração de ácido hipocloroso é determinada pelo pH, pela constante de dissociação ($\text{pK}_a = 7,5$ a 30°C) e pela concentração em cloro residual livre da solução. Esses fatores podem ser relacionados num rearranjo da equação de Henderson-Hasselbalch (equação 5):

$$\text{mg/L de HClO} = \frac{\text{mg/L de cloro residual livre}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad (\text{equação 5})$$

em que $\text{pH} = \text{pH}$ da solução utilizada; e
 $\text{pK}_a = 7,5$ (pK_a do ácido hipocloroso)

O ácido hipocloroso tem sido considerado o melhor agente na inativação bacteriana, por romper a fosforilação oxidativa e a atividade de outras membranas associadas. O íon ClO^- tem efeito instantâneo comparado com HOCl nos hipocloritos, dicloroisocianurato e cloramina T (McDonnel & Russell, 1999).

A atividade antimicrobiana aumenta com a diminuição do pH, pois ocorre a formação de ácido hipocloroso na presença de íons H⁺. Já o aumento do pH diminui a atividade antimicrobiana, devido ao fato de a reação ocorrer na direção inversa na presença de (OH)⁻, prevalecendo o íon hipoclorito (Giese, 1991; McDonnel & Russel, 1999).

Recomenda-se, geralmente, uma concentração de 100 mg/L de cloro residual livre, quando a sanificação é realizada por imersão ou circulação por 15 a 30 minutos de contato, e de 200 mg/L, quando o processo é por aspersão, ou nebulização com um tempo de contato de 15 a 20 minutos (Andrade & Macêdo, 1996).

2.8.1.2 Ácido peracético

O ácido peracético é produzido pela reação de ácido acético ou anidrido acético com peróxido de hidrogênio (equação 6):



Para prevenir a reação inversa, a solução de ácido peracético apresenta em sua formulação, além do ácido acético e do peróxido de hidrogênio, um estabilizante. Este pode ser um agente seqüestrante (pirofosfato de sódio) ou um agente quelante (8- hydroxyquinoline), que remove traços de metais, os quais aceleram a decomposição de peróxidos (Kitis, 2004).

As indústrias de alimentos, bebidas e laticínios têm aplicado amplamente o ácido peracético, que é um agente antimicrobiano mais potente que o peróxido de hidrogênio, por não ser afetado pela presença de catalase (Yokimi, 2001). O ácido peracético apresenta excelente ação sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, vírus, esporos bacterianos, cistos protozoários além de ser potente

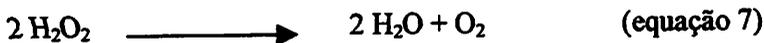
esporos, pois é eficaz em baixas concentrações (<0,3%) (McDonnell & Russell, 1999; Kitis, 2004).

O ácido peracético pode ser eficiente sob ampla faixa de temperatura, considerando que, assim como outros sanificantes, reduções microbianas aumentam com o aumento da temperatura da água durante a sanificação com este agente. Além disso, permanece efetivo na presença de matéria orgânica e decompõe-se em produtos não-tóxicos ao meio ambiente (Kitis, 2004). Tem sua atividade afetada pelo pH com maior atividade em baixos pH, assim, em condições alcalinas (pH 9), a espécie predominante está na forma ácida dissociada, resultando na diminuição da eficiência de sanificação (Kitis, 2004).

É provável que o mecanismo de ação do ácido peracético esteja relacionado com desnaturação de proteínas e enzimas e aumento da permeabilidade celular pela ruptura das ligações dissulfeto (S-S) e sulfidrilas (-SH) (McDonnell & Russell, 1999).

2.8.1.3 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é um forte oxidante devido à liberação do chamado oxigênio atômico [O], sendo há muito tempo utilizado como agente bactericida e esporicida (equação 7), demonstrando eficiência de grande espectro contra vírus, bactérias, leveduras, e esporos bacterianos. Em geral, proporciona maior atividade em bactérias gram-positivas do que em bactérias gram-negativas, embora a presença de catalase ou outras peroxidases nesses organismos possa aumentar a tolerância na presença de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio. Pode ser aplicado na esterilização e na sanificação de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos e como antiséptico (McDonnell & Russell, 1999).



As soluções de peróxido de hidrogênio não são estáveis, razão pela qual os produtos comerciais geralmente apresentam em sua composição substâncias orgânicas estabilizantes – acetanilida, uréia e ácido úrico, dos quais apenas a uréia não consome permanganato (Andrade & Macêdo, 1996; McDonnell & Russell, 1999).

Os métodos de detecção da quantidade do princípio ativo diferem. Sendo assim, quando o peróxido de hidrogênio for o único princípio ativo do sanificante deve-se utilizar o método iodométrico. Em contrapartida, em presença de ácido peracético, o peróxido de hidrogênio é determinado com titulação com permanganato de potássio.

As soluções comerciais de peróxido de hidrogênio são encontradas na forma de soluções aquosas contendo cerca de 6%, 12% ou 30% desse sanificante, freqüentemente chamadas de 20, 40 e 100 volumes, respectivamente. Esta terminologia é baseada no volume de oxigênio que é liberado, quando a solução é decomposta por aquecimento (Andrade & Macêdo, 1996).

Em concentrações baixas, o peróxido de hidrogênio atua sobre células vegetativas por meio de um processo de oxidação energética dos componentes celulares. Para agir como esporicida, há necessidade do uso de concentrações mais elevadas (10% a 30%), longo tempo de contato e temperatura adequada, visto que o peróxido de hidrogênio é estável a altas temperaturas (95°C – esterilização e 125°C – seguido de ar quente) e mais eficiente em condições mais ácidas com pH em torno de 4, (Andrade & Macêdo, 1996; McDonnell & Russell, 1999).

Como condições de uso do peróxido na indústria de alimentos indicam-se: concentrações de 0,3% a 30%, pH igual a 4,0 e temperatura ambiente até 80°C e tempo de contato variando de 5 a 20 minutos (Macêdo, 2001).

Peróxido de hidrogênio age como um oxidante por produzir radicais hidroxilas livres que atacam componentes celulares essenciais, incluindo lipídeos, proteínas e DNA (Kitis, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos, e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras – MG.

3.1 Microrganismo e padronização do inóculo

Foi utilizado como inóculo o microrganismo padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, gentilmente cedida pelo professor Henrique César Pereira Figueiredo, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. A cultura estoque foi em ágar triptona de soja (TSA) inclinado sob refrigeração.

A cepa padrão foi transferida para caldo infusão cérebro-corção (BHI), incubada a 37°C/24 horas. Após a incubação, a cultura foi centrifugada a 3.000 x g por 15min e os pellets obtidos foram ressuspensos (10 µL) em BHI. O inóculo foi padronizado, medindo-se, de 30 em 30 minutos, a densidade ótica a 620 nm e determinando-se a quantidade de células viáveis pela técnica de plaqueamento em microgota em Ágar Baird Parker. Pela curva de crescimento obtida, pôde-se delimitar a faixa de absorbância para se obter 10⁵ UFC/mL.

3.2 Suporte

Os suportes utilizados para adesão das células bacterianas foram cupons de aço inoxidável AISI 304 e vidro, ambos com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm. Os cupons foram higienizados individualmente com acetona 100%, lavados por imersão em detergente neutro durante 1h, enxaguados com água destilada estéril, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, os cupons foram novamente lavados com água destilada

estéril, secos por 2h a 60°C e autoclavados a 121°C/15 minutos (Rassoni & Gaylarde, 2000).

3.3 Adesão das células bacterianas

3.3.1 Obtenção do inóculo

Foi transferida uma alçada do inóculo para tubos contendo caldo BHI e incubada a 37°C/24 horas. Após a incubação, a cultura foi centrifugada (Centrifuge 5415C – eppendorf) a 3.000 x g por 15min e os pellets obtidos foram ressuspensos (10 µL) em 200 mL de caldo BHI. Após a obtenção do número de células viáveis vinte cupons foram colocados em placas de Petri contendo 60 mL de caldo BHI e 10 mL da cultura bacteriana. O experimento foi conduzido em triplicata, em três repetições, utilizando-se os cupons de aço inoxidável e vidro. As placas foram incubadas sob agitação branda, a 37°C por 48h. Após este período os cupons foram removidos, lavados com tampão fosfato salina estéril (PBS pH 7,4), removendo-se assim as células não aderidas.

Seguindo-se à lavagem, os cupons foram novamente embebidos em caldo BHI adicionado em placas de Petri. Esse procedimento foi repetido por 5 vezes, visando à formação completa de biofilme.

3.4 Enumeração das células no biofilme

Foi utilizada a técnica de lavagem superficial para a enumeração das células viáveis de biofilmes

3.4.1 Técnica do esfregão

Para enumerar as células de biofilme após 15 dias de incubação, dois cupons foram retirados de cada placa com pinça estéril, lavados com PBS para remover células não aderidas, e o biofilme foi removido com *swab* estéril. Os *swabs* foram transferidos para tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%

(p/v). Estes foram agitados por 2 minutos em vórtex. Após esse período, alíquotas foram tomadas e o número de células viáveis foi determinado em ágar Baird Parker, pela técnica da microgota. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, ao final deste período, foi realizada a contagem destas placas.

3.5 Sanificação

No teste de sensibilidade das células do biofilme, sanificantes como peróxido de hidrogênio, dicloro isocianurato de sódio e ácido peracético foram usados.

3.5.1 Peróxido de hidrogênio

Foram preparados 200 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 5% após a realização de testes laboratoriais. Após 15 dias de incubação, dois cupons de cada placa da solução foram imersos em tubos de ensaio contendo 5 mL da solução, durante 30 segundos, a 30°C. Durante o contato do sanificante com os cupons, dentro dos tubos de ensaio, estes foram movimentados suavemente para melhor contato do sanificante com as células aderidas. Os cupons foram transferidos para uma solução neutralizante (0,1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) por 30 segundos enxaguados com PBS e as células foram enumeradas após o uso do *swab* na superfície dos cupons e estes transferidos para tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% (p/v) e agitados por 2 minutos em vórtex. Alíquotas foram tomadas para enumeração em diluição seriada e plaqueada na superfície do ágar Baird Parker pela técnica da microgota. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as células foram quantificadas.

Antes do procedimento de sanificação, foi aferido o pH da solução de peróxido de hidrogênio e calculada a quantidade de peróxido residual livre utilizando o RQflex Plus (Merck), aparelho destinado a medir a quantidade de peróxido residual livre na amostra.

3.5.2 Dicloro isocianurato de sódio

Foram preparados 200 mL de solução de dicloro isocianurato de sódio a 100 mg/L, seguindo a concentração estabelecida pelo fabricante. Após 15 dias de incubação, dois cupons de cada placa foram imersos em tubos de ensaio contendo 5 mL da solução durante 30 segundos à temperatura ambiente. Durante o contato do sanificante com os cupons, dentro dos tubos de ensaio, estes foram movimentados suavemente para melhor contato do sanificante com as células aderidas. Os cupons foram transferidos para uma solução neutralizante (0,1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) por 30 segundos enxaguados com PBS e as células foram enumeradas após o uso do swab na superfície dos cupons e estes transferidos para tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% (p/v) e agitados por 2 minutos em vórtex. Aliquotas foram tomadas para enumeração em diluição seriada e plaqueada na superfície do ágar Baird Parker pela técnica da microgota. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após este período, as células foram quantificadas.

Antes do procedimento de sanificação, foi aferido o pH da solução de dicloro isocianurato de sódio e calculada a quantidade de cloro residual total (CRT). A solução de dicloro isocianurato de sódio foi diluída para 1mL da solução em 99 mL de água destilada pois, na presença de uma solução muito concentrada, o RQflex plus (Merck), aparelho destinado a medir a CRT da amostra, não realiza a leitura.

3.5.3 Ácido peracético

Foram preparados 200 mL de solução a base de ácido peracético a 0,3% (de acordo com o fabricante este percentual pode variar entre 390 mg/L a 540 mg/L de ácido peracético e 550 mg/L a 830 mg/L de peróxido de hidrogênio) seguindo a concentração indicada pelo fabricante Ecolab (1999). Após 15 dias

de incubação, dois cupons de cada placa foram imersos em tubos de ensaio contendo 5 mL da solução, durante 30 segundos, à temperatura ambiente. Durante o contato do sanificante com os cupons, dentro dos tubos de ensaio, estes foram movimentados suavemente para melhor contato do sanificante com as células aderidas. Os cupons foram transferidos para uma solução neutralizante (0,1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) por 30 segundos enxaguados com PBS e as células foram enumeradas após o uso do *swab* na superfície dos cupons e estes transferidos para tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% (p/v) e agitados por 2 minutos em vórtex. Alíquotas foram tomadas para a enumeração em diluição seriada e plaqueada na superfície do ágar Baird Parker, pela técnica da microgota. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após este período, as células foram quantificadas.

Antes do procedimento de sanificação, foi aferido o pH da solução a base de ácido peracético.

3.6 Análise de imagem por microscopia eletrônica de varredura

Os cupons ao final de 15 dias de incubação em caldo BHI, foram retirados em número de dois e duas superfícies (aço e vidro) das placas de Petri, lavados com PBS para remover as células não aderidas e imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificado) pH 7,2, por um período de 24 horas (este período pode ser estendido por semanas), lavados com tampão cocodilato (três vezes por 10 minutos cada para retirar os resíduos de glutaraldeído que podem reduzir o tetróxido de ósmio) e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora (máximo de 4 horas) sob temperatura ambiente, em uma capela. Após este período lavou-se por três vezes com 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 para completar a secagem, montado em *stubs* e coberto com ouro. Ao final deste

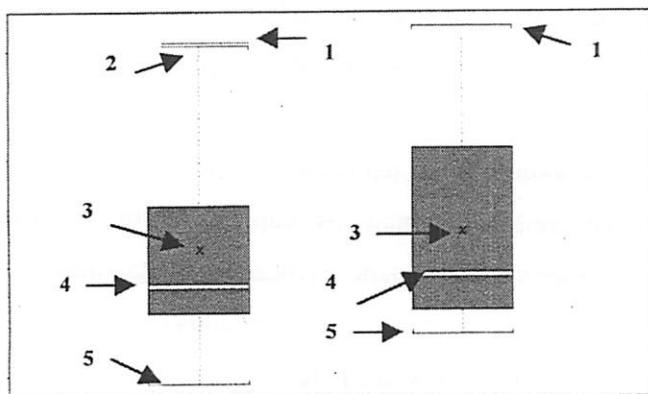
procedimento, os cupons foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (Evo40 Leo), com o objetivo de avaliar a interação entre bactéria e superfície. Outros dois cupons de duas superfícies (aço e vidro), ao final de 15 dias de incubação, foram sanificados com solução de peróxido de hidrogênio, dicloro isocianurato de sódio e ácido peracético. Seguiu-se o mesmo protocolo para a avaliação de biofilme. Então os cupons foram examinados em microscópio eletrônico de varredura para verificar as células aderidas que não foram removidas pela ação dos sanificantes (Alves, 2004).

Foi desenvolvido um box de vidro para armazenagem dos cupons antes e após sanificação em solução fixativa de (Karnovisk's modificado) pH 7,2, para serem visualizados pela microscopia eletrônica de varredura.

3.7 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em três repetições e em triplicata, tendo, de cada placa, sido retirados 2 cupons. As principais questões a serem respondidas por esta análise são: qual o efeito dos sanificantes sobre biofilme e superfície sobre o log da contagem e se os sanificantes sobre biofilme e superfície atuam independentemente sobre log da contagem. Para se obter essas respostas realizou-se uma análise de variância fatorial com 2 fatores de 2 e 4 níveis por fator. Para tanto, foram conduzidas: análises de variância para verificar a importância estatística de cada fator principal e interações no log da contagem, construção de Boxplots para as observações dos indicadores para cada concentração de cada fator conforme descrito em Hoaglim et al. (1983), comparações múltiplas entre os níveis de cada fator (Hsu, 1966) e a construção do gráfico da interação para biofilme/sanificante x superfície.

A Figura exemplifica o boxplot (Box, 1978) utilizado.



1 – Valor mais alto encontrado no log da contagem (UFC/cm²)

2 – Valor atípico encontrado próximo ao valor mais alto do log da contagem (UFC/cm²)

3 – Média do log da contagem (UFC/cm²)

4 – Mediana que demonstra que a maior concentração dos valores encontrados está abaixo dela

5 - Valor mais baixo encontrado no log da contagem (UFC/cm²)

FIGURA 2 Esquema ilustrando o BoxPlot utilizado

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adesão bacteriana às superfícies de aço inoxidável e vidro.

Podem ser observadas, na Tabela 1, as contagens obtidas de células de *S. aureus* aderidas às superfícies de aço inoxidável e vidro.

Vários fatores podem ter influenciado a adesão de *S. aureus* às superfícies, assim como a temperatura utilizada para o crescimento de *S. aureus* nas superfícies de vidro e aço inoxidável. A temperatura ótima de crescimento (37°C) foi utilizada, o que favorece a multiplicação das células, como determinado por Morton et al. (1998), tendo a temperatura sido um dos fatores responsáveis pela capacidade de adesão de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fragi* em superfícies de PVC.

A adesão apresentada por *S. aureus* nas superfícies de vidro e aço inoxidável nesta pesquisa pode ser explicada por vários fatores, como a carga elétrica negativa que bactérias gram-positivas e gram-negativas apresentam em pH neutro. Utilizou-se o caldo BHI, meio rico em nutrientes e recomendado para o crescimento de microrganismos. O metabolismo do microrganismo pode

TABELA 1 Contagens obtidas das células de *Staphylococcus aureus* aderidas às superfícies de aço inoxidável e vidro.

Superfície	Repetição	UFC/cm ²	Log (UFC/cm ²)
Vidro	1	10 ⁸	8,57
	2	10 ⁸	8,64
	3	10 ⁸	8,57
Aço	1	10 ⁷	7,25
	2	10 ⁸	8,18
	3	10 ⁷	7,73

gerar condições que são mais ou menos favoráveis à adesão, afetando, por exemplo, as características de carga superficial. Mosteler & Bishop (1993) citam que a espécie, o meio de cultura e a concentração do microrganismo também podem afetar o processo de adesão.

A adesão de células bacterianas, como as de *S. aureus* em superfícies de vidro e aço inoxidável detectado neste trabalho, foi também observada por Mafu et al. (1990), ao estudarem a adesão de *Listeria monocytogenes* nas superfícies de aço inoxidável, vidro, polipropileno e borracha. Esses autores observaram que o microrganismo aderiu em todas as superfícies.

Já a adesão de *S. aureus* à superfície de aço inoxidável não foi demonstrada por Parizzi (1999), ao avaliar a adesão de *S. aureus* ATCC 6538 e *Listeria innocua* L6a em cupons de aço inoxidável AISI 304, policarbonato e polipropileno, esta autora pôde observar que *S. aureus* apresentou melhor adesão em policarbonato pela contagem padrão em placas e em policarbonato e polipropileno. pela microscopia de epifluorescência, enquanto *L. innocua* apresentou melhor aderência sobre a superfície de aço inoxidável. Esta diferença pode ter ocorrido devido ao isolado utilizado neste trabalho quanto comparado aos utilizados por Parizzi, visto que *S. aureus* ATCC 25923 é um microrganismo padrão para a determinação de resistência a antibióticos.

Dados inferiores aos encontrados neste trabalho foram observados por Oliveira et al. (1998), que avaliaram a adesão de *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus cereus* em cupons de vidro de 1 cm², durante 12 horas de contato com as suspensões destes esporos a 32°C, contendo 10⁶ esporos /mL. Constataram-se as adesões máximas, expressas em log₁₀ de UFC/cm², de 4,7 em quatro horas, 4,5 em oito horas e 4,0 em duas horas, para *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* e *B. cereus*, respectivamente.

A Tabela 1A apresenta os dados da análise de variância da comparação entre a formação de biofilme nas diferentes superfícies e demonstra que houve variabilidade entre as superfícies estudadas, ou seja, a média do log do número de células aderidas na superfície de vidro foi superior à média do log do número de células aderidas na superfície de aço inoxidável, como demonstrado na Figura 3.

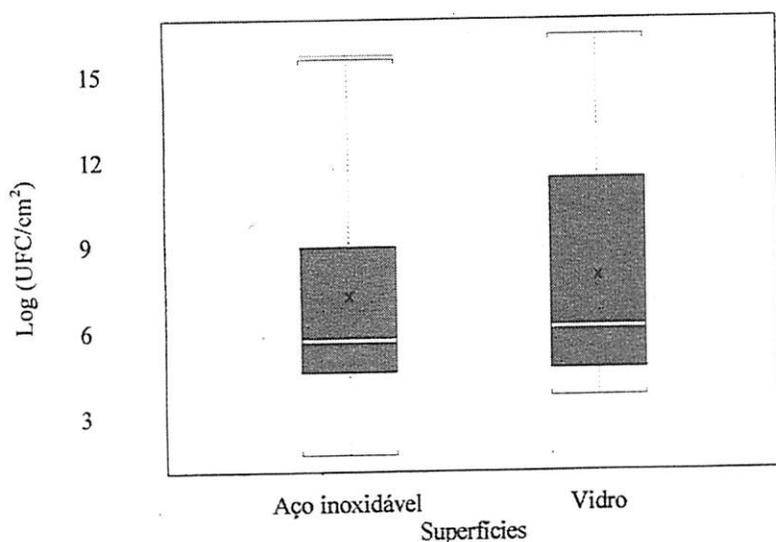


FIGURA 3 Média do log do número de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderidas nas superfícies de cupons de vidro e aço inoxidável AISI 304.

Para detectar e visualizar onde ocorreu a diferença, realizaram-se comparações múltiplas, que podem comprovar que a superfície de vidro promoveu maior adesão de células de *S. aureus* do que a superfície de aço inoxidável, como demonstrado na Figura 4.

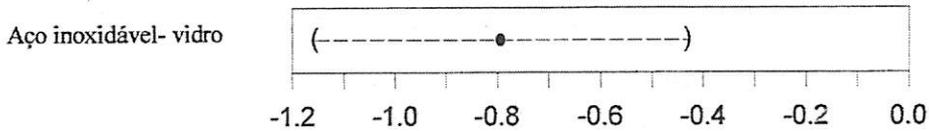


FIGURA 4 Comparações múltiplas entre adesão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e vidro.

A melhor adesão de *S. aureus* na superfície de vidro pode ser explicada pela elevada carga elétrica apresentada pelo vidro, que faz com que o mesmo propicie melhor processo de aderência do que superfícies com menor carga como o poliestireno (Zotolla & Sasahara, 1994).

Para o exame da superfície das amostras, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pôde-se observar células de *S. aureus* aderidas nas superfícies de cupons de vidro e aço inoxidável após 15 dias de incubação a 37°C, como demonstrado na Figura 5 (A,B).

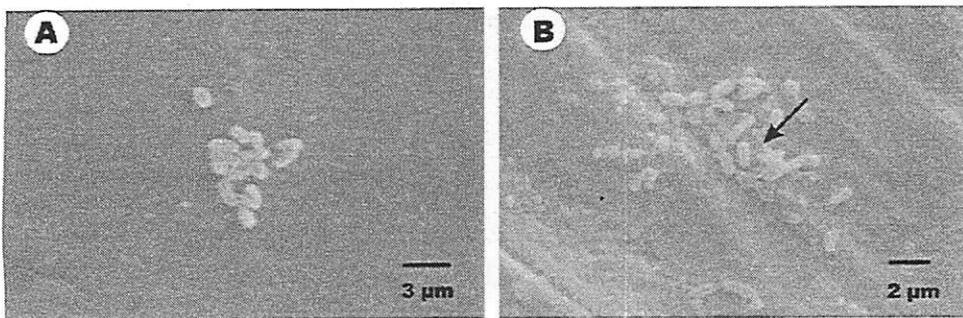


FIGURA 5 Eletromicrografia de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderidas nas superfícies de vidro (A) e aço inoxidável (B), observadas por microscopia eletrônica de varredura.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu a verificação da interação da bactéria com a superfície e pode ser utilizada como técnica (semi) quantitativa. Por esta técnica, a quantificação se torna difícil, pois o microrganismo pode estar agrupado e, quando as densidades populacionais são baixas, torna-se difícil a detecção de células.

Fator relevante observado foi a produção da matriz exopolissacarídica por *S. aureus* na superfície dos cupons. A importância dessa matriz exopolissacarídica pôde ser observada por Tsuneda et al. (2003). Esses autores relataram que a adesão de bactérias heterotróficas, isoladas a partir de um reator de tratamento de água, em pérolas de vidro, é inibida por interações eletrostáticas sendo de relevante importância por alterar características físico-químicas da superfície como carga, hidrofobicidade e propriedades poliméricas.

Sendo assim, superfícies bacterianas e superfícies de contato apresentam, na sua maioria, carga elétrica negativa o que causaria repulsão entre bactéria e substrato. Porém, estas cargas de superfície podem atrair íons com carga contrária, que estão presentes na fase aquosa circundante, o que pode ter promovido a adesão de *S. aureus* nas superfícies de aço inoxidável e vidro encontrada neste trabalho.

4.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme

Para as superfícies estudada, de vidro e aço inoxidável, *S. aureus* apresentou adesão máxima de 10^8 UFC/cm² e 10^7 UFC/cm² respectivamente, após 15 dias de incubação, indicando formação de biofilme e não de adesão bacteriana. Zotolla & Sasahara (1994) citam que, para haver formação de biofilme a adesão deve estar entre 10^6 - 10^7 UFC/cm² e valores inferiores a este poderiam ser indícios apenas de adesão. A contagem padrão em placas obtida

após remoção do biofilme por *swab* e uso do vórtex pôde determinar que houve formação de biofilme, como demonstrado na Figura 6 em ambas as superfícies.

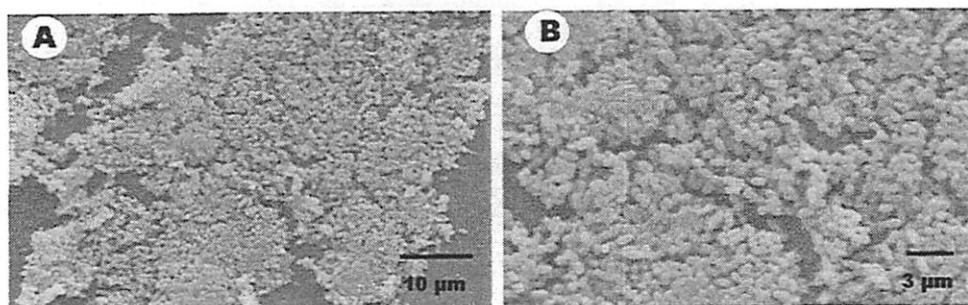


FIGURA 6 Eletromicrografias de biofilme formado por *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderido nas superfícies de aço inoxidável (A) e vidro (B).

Dados apresentados neste trabalho, indicando formação de biofilme podem ser explicados pelo tempo de contato entre a cultura de *S. aureus* e os cupons de vidro e aço de 15 dias (360 horas). Resultados inferiores foram encontrados por Parizzi (1999), que constatou entre 10 e 12 horas de incubação adesão máxima de 10^5 UFC/cm² e 10^6 UFC/cm², tanto para *L. innocua* L6a quanto para *S. aureus* ATCC 6538, independente da superfície estudada, sugerindo então adesão e não formação de biofilme. Isso demonstra que, para se avaliar formação de biofilme, são necessários períodos maiores de exposição à cultura em estudo.

A importância do tempo de contato da superfície e da suspensão para se avaliar formação de biofilme, como encontrada neste trabalho, também pode ser observada na pesquisa realizada por Gândara & Oliveira (2000). Segundo esses autores placas de aço inoxidável de 20 cm² foram incubadas a 45°C, com leite inoculado com cerca de $1,0 \times 10^2$ UFC/cm² de uma linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus*, durante 6 horas, sob agitação. Após três horas de

contato, o número de células aderidas foi de $1,6 \times 10^1$ UFC/cm² e, em seis horas de $1,9 \times 10^4$ UFC/cm², os autores sugerem que esta contagem possivelmente aumentaria com o elevação do tempo de contato.

Os dados encontrados nesta pesquisa foram similares ao de Joseph et al. (2001), que observaram densidades populacionais de duas culturas de *Salmonella* isoladas de carne de ave, *Salmonella weltevreden* e *Salmonella* FCM40, de 10^6 UFC/cm² para as duas culturas, após tempo de contato de 48 horas em superfície de aço inoxidável.

Não existem na literatura muitos dados disponíveis sobre adesão e ou formação de biofilme de *S. aureus* sobre superfícies de aço inoxidável e vidro o que dificulta a comparação dos dados obtidos nesta pesquisa.

Embora *S. aureus* não seja dotado de estruturas de adesão, ele foi capaz de secretar a matriz de polímeros no período de 15 dias de incubação com troca de meio a cada 72 horas, condições utilizadas neste trabalho, o que pode ter ocasionado um estresse dentro do biofilme formado. Esse fator tem sido fonte de estudos recentes que sugerem que, em resposta a esse estresse, ocorrem 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).

O que pode ser observado pelas eletromicrografias dos cupons de aço inoxidável foi a presença de fendas e ranhuras (Figura 7) sobre a superfície do aço inoxidável, que permitem que as bactérias se alojem e iniciem sua multiplicação (Tide et al., 2000). Na presença de fendas, verificaram-se a adesão e possível formação de biofilme, como constataram Verran et al. (2000), quando mencionam que, com o aumento de irregularidades na superfície de aço inoxidável, há aumento no número de microrganismos aderidos.

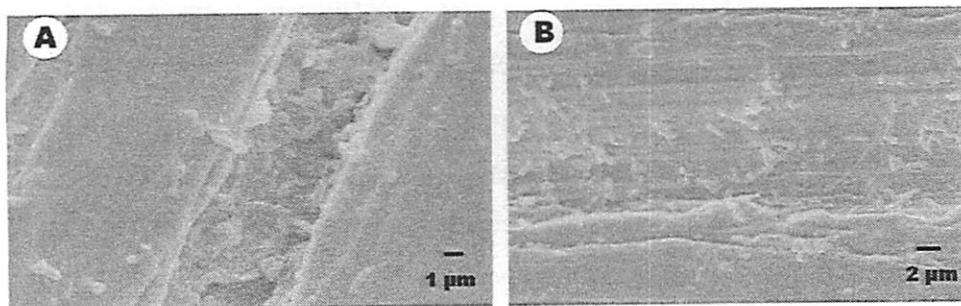


FIGURA 7 Eletromicrografias de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderidas em fendas e ranhuras de aço inoxidável.

4.3 Ação dos sanificantes na remoção de biofilme formado por *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nas superfícies de aço inoxidável e vidro

As Tabelas 2 e 3 apresentam as contagens obtidas de células de *S. aureus* aderidas nas superfícies de vidro e aço inoxidável, antes e após o uso dos sanificantes dicloro isocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético.

TABELA 2 Contagens obtidas das células de *Staphylococcus aureus* aderidas nas superfícies de vidro, após uso das soluções sanificantes

Sanificantes	Repetição	Nº inicial	Nº final	RD
Dicloro isocianurato de sódio a 100 mg/L	1	8,57	4,09	4,48
	2	8,64	3,80	4,84
	3	8,57	3,91	4,66
Peróxido de hidrogênio a 500 mg/L	1	8,57	4,50	4,07
	2	8,64	3,94	4,70
	3	8,57	4,26	4,31
Acido peracético entre 390 e 540 mg/L de ácido peracético	1	8,57	3,29	5,28
	2	8,64	3,30	5,34
	3	8,57	3,41	5,16

TABELA 3 Contagens obtidas das células de *Staphylococcus aureus* aderidas nas superfícies de aço inoxidável, após uso dos sanificantes dicloro isocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético.

Sanificantes	Repetição	Nº inicial	Nº final	RD
Dicloro isocianurato de sódio a 100 mg/L	1	7,25	4,23	3,02
	2	8,18	4,16	4,02
	3	7,73	4,20	3,53
Peróxido de hidrogênio a 500 mg/L	1	7,25	3,21	4,04
	2	8,18	3,28	4,90
	3	7,73	3,71	4,02
Acido peracético entre 390 e 540 mg/L de ácido peracético	1	7,25	3,32	3,93
	2	8,18	2,93	5,25
	3	7,73	3,37	4,36

Os resultados deste trabalho demonstraram a solução de ácido peracético como sendo a mais efetiva na remoção do biofilme formado por *S. aureus* nas superfícies de aço inoxidável e vidro, quando comparada com a ação do dicloro isocianurato de sódio e do peróxido de hidrogênio.

A melhor ação do ácido peracético pôde ser detectada por Moraes (1996), que avaliou a resistência de cinco isolados de esporos de bactérias aeróbias mesófilas de equipamentos de abatedouro de aves pelo teste de suspensão. Esse autor utilizou o tempo de contato de 30 minutos e as soluções de hipoclorito de sódio contendo 100 mg/L, dicloro isocianurato de sódio contendo 150 mg/L e ácido peracético contendo 300 mg/L. Verificou que o hipoclorito de sódio e o ácido peracético foram mais eficientes, ambos obtendo 2,2RD, enquanto o dicloro isocianurato de sódio obteve 0,8RD.

Mosteller & Bishop (1993) também detectaram essa eficiência ao utilizarem vários sanificantes, como hipoclorito de sódio e ácido peracético, sobre células de *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* aderidas nas superfícies de borracha e teflon. Estes autores observaram que o ácido peracético, na concentração de 200 mg/L, promoveu a redução de 2,2; 4,0; 4,33 nas células aderidas na superfície de borracha, enquanto que para as células aderidas na superfície de teflon, as reduções foram de 2,57, 3,3 e 4,3 respectivamente.

Maior redução decimal obtida pelo ácido peracético no biofilme formado na superfície de vidro do que o biofilme formado na superfície de aço inoxidável pode ser explicada pela presença de fendas e ranhuras no aço inoxidável. Estas favorecem a multiplicação celular e dificultam a ação de agentes sanificantes. Células aderidas são mais resistentes à ação de sanificantes do que as células planctônicas, devido ao desenvolvimento da resistência sobre as superfícies colonizadas, visto que, esses agentes têm ação limitada pela reação química com a matriz do biofilme (Meyer, 2003). Pesquisas demonstraram 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.

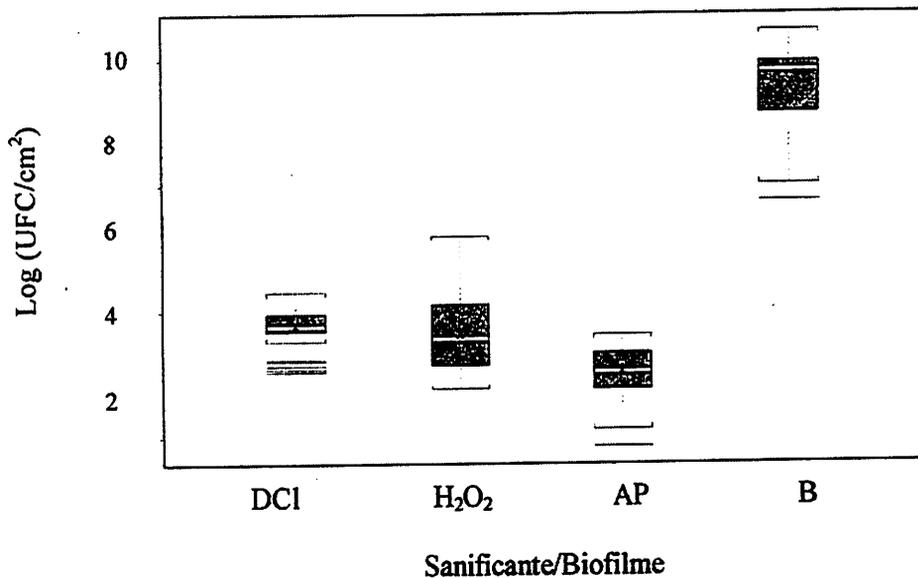
Os sanificantes utilizados na indústria, em testes laboratoriais dentro das condições indicadas pelos fabricantes, são aprovados em testes como os de suspensão e diluição de uso, alcançando até 5 reduções decimais (RD) após 30 segundos de contato a 20°C com suspensões de microrganismos que são capazes de iniciar processos de adesão às superfícies (Andrade & Macêdo, 1996).

De maneira geral, a maioria dos sanificantes utilizados na desinfecção de superfícies de aço inoxidável apresenta resultados satisfatórios na remoção de biofilme como constatado por Zottola & Sasahara (1994). Estes autores demonstraram que *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* cresceram e aderiram em cupons de aço inoxidável após contato entre 5 a 10 dias com a superfície e formaram biofilme, onde a densidade populacional excedeu 10^8 UFC/cupom. Após o uso do sanificante, não sendo mencionado qual sanificante nem a concentração, a população bacteriana foi reduzida em 50% e, quando se utilizou a combinação de detergente e sanificante, todas as células foram inativadas.

A melhor atuação do ácido peracético sobre células de *S. aureus* aderidas nas superfícies de cupons de vidro e aço inoxidável encontradas neste trabalho pode ser comparada ao teste de suspensão sobre células de *P. fragi* e *P. aeruginosa* realizado por Wirtanen et al. (2001). Estes autores utilizaram várias soluções de sanificantes, dentre elas a de ácido peracético a concentração de 0,5% (v/v) e hipoclorito de sódio a 0,67% (v/v). Observaram que a solução de ácido peracético foi mais efetiva na remoção de células de *Pseudomonas* aderidas à superfície de aço inoxidável após 30 minutos de contato com a solução sanificante.

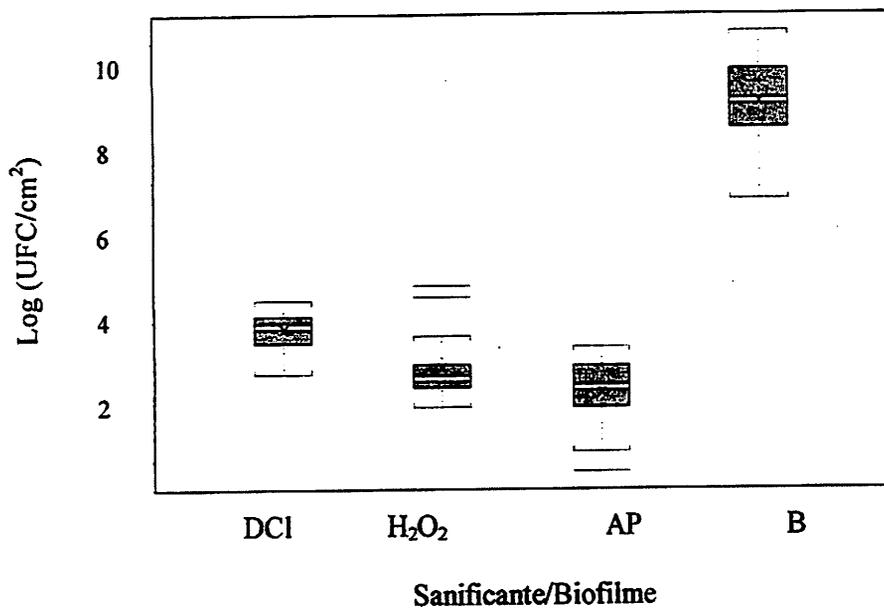
Holah et al. (1990), ao testarem sanificantes cujo composto ativo era o ácido peracético, iodo, cloro e quaternário de amônia, observaram que, sobre células de *S. aureus*, *Proteus mirabilis* e *P. aeruginosa* aderidas em cupons de aço inoxidável, o ácido peracético foi mais eficiente na remoção das células aderidas.

A Tabela 1A apresenta os dados da análise de variância, na qual pode-se observar que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os sanificantes utilizados, dicloro isocianurato de sódio a 100 mg/L, peróxido de hidrogênio a 500 mg/L e ácido peracético entre 390 e 540 mg/L de ácido peracético e entre 550 e 830 mg/L de peróxido de hidrogênio, sobre as células de *S. aureus* aderidas nas superfícies de aço inoxidável e vidro, como demonstrado nas Figuras 8 e 9.



*DCI – dicloro isocianurato de sódio
 H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
 AP – ácido peracético
 B – biofilme vidro

FIGURA 8 Média do log do número de células aderidas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na superfície de cupons de vidro, após o uso dos sanificantes dicloro isocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético.



*DCl – dicloro isocianurato de sódio
 H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
 AP – ácido peracético
 B – biofilme aço inoxidável

FIGURA 9 Média do log do número de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderidas na superfície de cupons de aço inoxidável AISI 304, após o uso dos sanificantes dicloro isocianurato, peróxido de hidrogênio e ácido peracético.

Para detectar e visualizar onde ocorreu a diferença, realizaram-se comparações múltiplas, como demonstrado na Figura 10.

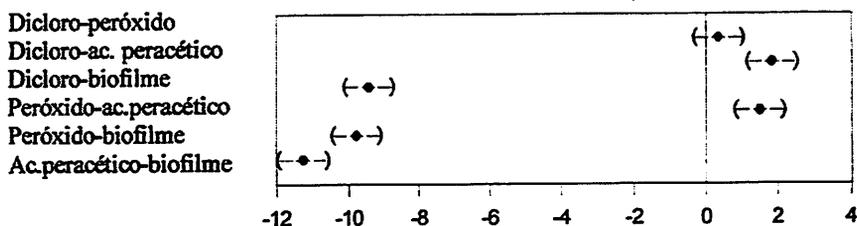


FIGURA 10 Comparações múltiplas entre sanificantes dicloro isocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético aplicados nas células aderidas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e vidro.

A eficiência do ácido peracético obtida neste trabalho pode ser explicada pela grande capacidade de oxidação dos componentes celulares que o torna excelente sanificante pelo fato desse agente estar em equilíbrio com o peróxido de hidrogênio e o ácido acético. Sendo de grande importância a concentração que pode estar presente de peróxido de hidrogênio, cuja ação também é por meio de um processo de oxidação dos componentes celulares.

As concentrações de ácido peracético e peróxido de hidrogênio não foram determinadas neste trabalho, visto que o método apresentado pelo fabricante não especifica as concentrações exatas dos reagentes para titulação. Mas, o fabricante cita que este produto contém entre 390 mg/L e 540 mg/L de ácido peracético, concentração que está entre a recomendada pela indústria, que varia entre 300 e 700 mg/L, segundo Andrade & Macêdo (1996).

As eletromicrografias dos cupons de aço inoxidável e vidro, após o uso dos sanitizantes dicloro isocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético, podem ser observadas na Figura 11.

Cada vez mais, um correto e eficaz processo de higienização é fundamental, visto que a *American Public Health Association* (APHA) recomenda um limite máximo tolerável de 2 UFC/cm² para que uma superfície esteja adequada para processar alimento, enquanto Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere 30 UFC/cm². Assim, constata-se, pelos resultados obtidos nesta pesquisa que dicloro isocianurato de sódio, o peróxido de hidrogênio e ácido peracético, nas condições utilizadas, não foram eficientes na total inativação de células de *S. aureus* das superfícies aderidas às de vidro e aço inoxidável.

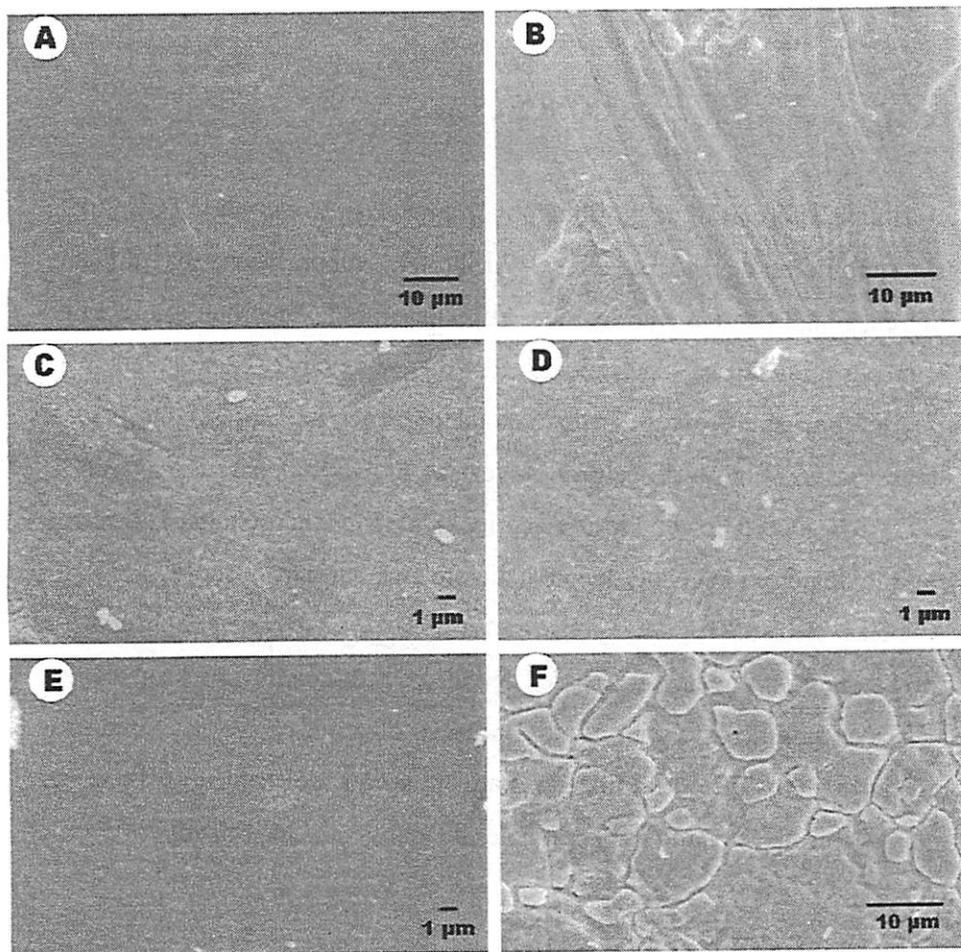


FIGURA 11 Eletromicrografia de células aderidas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderidas nas superfícies de vidro e aço inoxidável, após sanificadas com as soluções de dicloro isocianurato de sódio (A, B), peróxido de hidrogênio (C, D) e ácido peracético (E, F).

5 CONCLUSÕES

Houve a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nas superfícies de aço inoxidável AISI 304, embora tenha havido uma diferença significativa entre as duas superfícies, indicando que a adesão de *S. aureus* foi maior na superfície do vidro do que na de aço inoxidável.

Entre os sanificantes usados, o ácido peracético apresentou melhor eficiência na redução de células viáveis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 das superfícies de vidro e aço inoxidável, quando comparado com a atuação do peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio.

Pelas eletromicrografias observadas pela MEV, pôde-se observar a adesão de *S. aureus* nas superfícies de vidro e aço inoxidável e produção da matriz de polímeros, assim como a atuação dos sanificantes nas condições utilizadas e o método utilizado para remoção de células viáveis do microrganismo estudado nas superfícies de vidro e aço inoxidável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Introdução a Microscopia Eletrônica de Varredura, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural.** 2004. p. 43.

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de Alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1996. 1802 p.

AKHTAR, M.; PARK, C.E.; RAYMAN, K. Effect of urea treatment on recovery of Staphylococcal enterotoxin a from heat-processed foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.9, p.3274-3276, Sept. 1996.

BEECH, W. B.; SUNNER J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 3, p. 181-186, June 2004.

BEHME, R. J.; SHUTTLEWORTH, R.; McNABB, A.; COLBY, W. D. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 34, n. 12, p. 3075-3084, Dec. 1996.

BETLEY, M. J.; HARRIS, T. O. Staphylococcal enterotoxins: genetic characterization and relationship between structure and emetic activity. **Food Microbiology**, London, v. 11, n. 2, p. 109-121, Apr. 1994.

BLOMFIELD, S. F.; ARTHUR, M.; KLINGEREN, B. V.; PULLEN, W.; HOLAH, J. T.; ELTON, R. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 86-94, Jan. 1994.

BOX, G. E. P, HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. (1978). **Statistics foExperimenters.** New York, John Wiley & Sons.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substract. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 165-173, June 1987.

CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Frequência de *Listeria* sp. e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 1995, Juiz de fora, Minas Gerais. **Anais...** Juiz de Fora, Minas Gerais, 1995. p. 95-97.

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

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.

DALTON, H. M.; MARCH, P. E. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 9, n. 3, p. 252-255, June 1998.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIERVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan. 2000.

ECOLAB. **Vortexx**. [S. l.]: 1999. (Informativo técnico).

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.

GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 1-7, jan./abr. 2000.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos.** São Paulo: Nobel, 1998. 284 p.

GIESE, J. Rapid microbiological testing kits and instruments. **Food Technology**, Chicago, v. 49, n. 7, p. 64-71, July 1995.

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

GOMES, H. A.; GALLO, C. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal" comercializados em Piracicaba-SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 158-161, jul./dez. 1995.

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

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

HAWRONSKYJ, J. M.; HOLAH, J. ATP: A universal hygiene monitor. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 79-84, Mar. 1997.

HOAGLIM, D. C., MOSTELLER, F., TUKEY, J. W. (1983). **Understanding Robust and Exploratory Data Analysis**. New york: John Wiley & Sons.

HOLAH, J. T.; JOGGS, C.; RPBINSON, S.; WORTHINGTON, D. SPENCELY, H. A conductance based surface disinfection test for food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 225-259, 1990.

HOOD, S.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 8-18, Feb. 1995.

HSU, J. C. **Multiple comparisons: theory and methods**. London: Chapman & Hall, 1996.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - ICMSF. **Microorganisms in foods: characteristics of microbial pathogens**. London: Black Academic & Professional, 1996.

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**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 364-367, Mar. 2001.

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

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

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, June 1998.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single and binary biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 11, p. 1186-1191, Nov. 1995.

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

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

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 9, p. 742-746, Sept. 1990.

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

McDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 147-179, Jan. 1999.

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

MEYER, T. S. Uso do cloro na desinfecção da água, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 99-110, jan./mar. 1994.

MEYRAND, A.; ATRACHE, V.; BAVAI, C.; MONLET, M. P.; VERNOZZ-ROZAND, C. Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 411-415, June 1999.

MORAES, M. S. V. **Isolamento de esporos aeróbios mesófilos e termófilos em equipamentos de abatedouro de aves e avaliação de suas resistências a sanificantes químicos**. 1996. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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**, Oxford, 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 Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 1, p. 34-41, Jan. 1993.

NOTERMANS, S. The significance of biofouling to the food industry? **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 107-114, July 1994.

NOTERMANS, S.; WERNARS, K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 91-102, Jan. 1991.

OLIVEIRA, A. D.; AKUTSU, C. K.; ANDRADE, N. J. Adesão de esporos de *Bacillus* em vidro e polietileno avaliada por microscopia de contraste de fase e contagem em placas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1998. p 140.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela Microscopia de Epifluorescência e Contagem em Placas.** 1999. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PARK, C. E.; RAYMAN, M. K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of Staphylococcal enterotoxins A, B, C and D and E in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 677-681, Feb. 1994.

POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 4, p. 361-365, Aug. 2000.

RASSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparason of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 81-85, Jan. 2000.

RICHARD, H. A.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trens in Microbiology**, London, v. 11, n. 2, p. 94-99, Feb. 2003

ROCHA, C. F.; VILELA, M. A. P.; PINTO, C. L. O. Aspectos de higiene e métodos de avaliação de procedimentos de limpeza e sanificação na indústria de laticínios. **Revista do Instituto Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n 309, p. 197-204, 1999.

RODRIGUES, F. T. et al. Características microbiológicas de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Viçosa-MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 7., 1995, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 1995. p. 233-235.

ROSEC, J. P.; GIGAYD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1/2, p. 61-70, July 2002.

SABIONI, J. G. et al. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto (MG). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 22-23, jan./fev. 1994.

SHEBUSKI, J. B.; VILHELMSSON, O.; MILLER, K. J. Effects of growth at low water activity on the thermal tolerance of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 9, p. 1277-1281, Sept. 1983.

STANLEY, N. R.; LAZAZZERA, B. A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 917-924, May 2004.

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.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. **Microbiologia**, 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

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

TYDRICH, L. New applications for ATP bioluminescence methods. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 41, n. 6, p. 463-465, Nov./Dec. 1996.

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

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**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 99-105, Sept./Oct. 2000.

VOUNG, C.; SAENZ, H. L.; GOTZ, F.; OTTO, M. Impact of the *agr* Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 182, n. 6, p. 1688-1693, Dec. 2000.

WICKRAMANAYAKE, G. B.; SPROUL, O. J. Kinetics of the inactivation of microorganisms. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4. ed. Pennsylvania: Lea e Febiger, 1991. p 72-84.

WIRTANEN, G.; HELANDER, I. M.; MATILLA-SANDHOLM T. Microbial methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 37-50, Jan. 2000.

YOKIMI, C. Adesão de esporis de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ZACHEUS, O. M.; IIVANAINEN, E. K.; NISSINEN, T. K.; LEHTOLA, M. J.; MARTIKAINEN, P. J. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **Water Resources**, v. 34, n. 1, p. 63-70, Jan. 2000.

ZOLTAI, P. T.; ZOTTOLA, E. A.; MCKAY, L. L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 44, n. 3, p. 204-208, Mar. 1981.

ZOTTOLA, E. A. Special techniques for studying microbial biofilms in food system. In: TORTORELLO, M. L.; GENDEL, S. M. (Ed.) **Food microbial analysis: new technologies**. IFT basic symposium series. New York: Marcell Dekker, 1997. Cap. 16, p. 315-3346.

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

ANEXOS

FIGURA 1A Gráfico de probabilidade normal para testar a adequabilidade do modelo ajustado

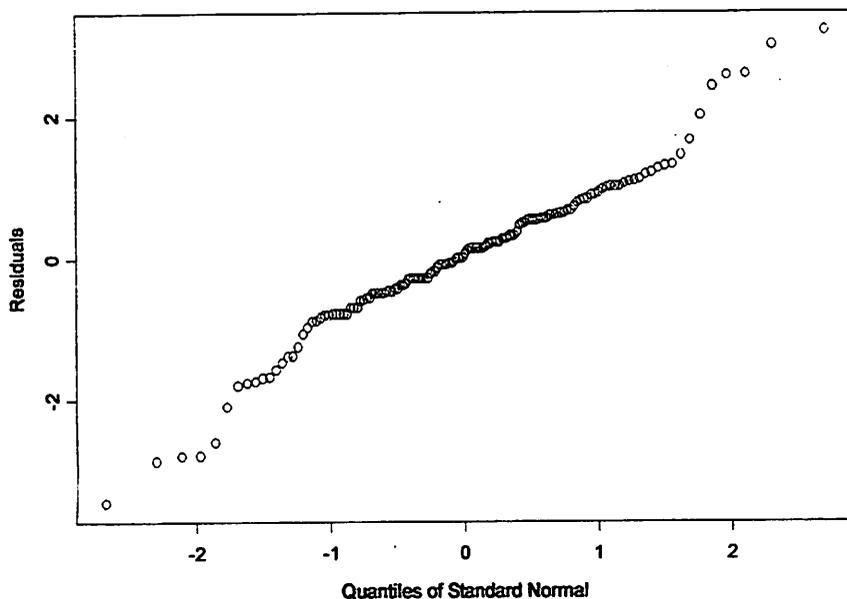


TABELA 1A Análise de variância entre biofilme formado por *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nas superfícies de vidro e aço inoxidável e ação dos sanificantes na inativação de células aderidas de ambas superfícies.

FV	GL	QM	5%
Superfície	1	22.6731	0.00002922332
Biofilme	3	950.3380	0.00000000000
Superfície-Biofilme	3	12.4543	0.00000382759
Resíduo	136	1.2117	

TABELA 2A Valores estabelecidos para comparações múltiplas entre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aderido nas superfícies de vidro e aço inoxidável

Superfícies	Estimativa de diferença	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior
Aço-vidro	-0,794	0,183	-1,16	-0,431****

TABELA 3A Valores estabelecidos para comparações múltiplas entre os sanificantes dicloro isocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético com os biofilmes formados pelas células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Sanificantes	Estimativa de diferença	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior
Dicloro isocianurato de sódio-peróxido de hidrogênio	0,342	0,259	-0,333	1,02
Dicloro isocianurato de sódio-ácido peracético	1,830	0,259	1,160	2,50***
Dicloro isocianurato de sódio-biofilme	-9,430	0,259	-10,100	-8,75***
Peróxido de hidrogênio-ácido peracético	1,490	0,259	0,813	2,16***
Peróxido de hidrogênio-biofilme	-9,770	0,259	-10,400	-9,10***
Ácido peracético-biofilme	-11,300	0,259	-11,900	-10,60***

FIGURA 2A Interação entre média do log do número de células de *Staphylococcus aureus* aderidas nas superfícies de vidro a aço inoxidável AISI 304 e células não removidas pelos sanificantes peróxido de hidrogênio, dicloro isocianurato de sódio e ácido peracético.

