

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

**Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na
inativação de *Pseudomonas fluorescens***

Marcela Andrea Durán Haun

Orientador: Marcelo Cristianini

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas, Para a obtenção do título de
Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas- SP
2004

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo Cristianini (orientador)

Dr. Mauro F. F. Leitão (membro)

Dra. Lucia Regina Durrant (membro)

Dr. Salvador Massaguer Roig (membro)

Aos meus pais, marido e filho, por todo o carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, ao Laboratório de Química biológica do Instituto de Química, ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia da FEA, ao Laboratório de Microestrutura de Alimentos do Departamento de Ciências de Alimentos da FEA, pelo suporte científico e infra-estrutural.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Marcelo Cristianini pela orientação, apoio e ajuda no desenvolvimento de todo o trabalho.

À Ana Lourdes Gândara pelo ensinamento técnico em microbiologia e ajuda prática no desenvolvimento de todas as etapas desta tese.

Ao Prof. Mauro F.F. Leitão pelas sugestões.

Aos Membros da Banca Examinadora pelas correções, indagações e sugestões.

Ao Prof. Nelson Durán por todo o incentivo e auxílio na busca de novos artigos.

A todos os membros de minha família em especial ao meu esposo por toda a paciência e até ajuda prática.

RESUMO

Um dos problemas que enfrenta a indústria de laticínios é a recontaminação do leite decorrente da formação de biofilmes em tanques de armazenamento e trocadores de calor.

A tecnologia de esterilização de materiais por gás plasma tem sido utilizada com sucesso na esterilização de instrumentos cirúrgicos, oftálmicos e dentários.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência de um sistema de esterilização a gás plasma sob células de *Pseudomonas fluorescens* aderidas em placas de aço inoxidável utilizando o leite como substrato. Foram avaliadas as variáveis tempo de pré plasma, tempo de exposição ao plasma e potência do mesmo na remoção do biofilme.

As placas de aço inoxidável com a bactéria aderida foram submetidas a um tratamento com gás plasma, que foi formado a partir de um produto comercial composto por ácido peracético, peróxido de hidrogênio e ácido acético.

Dois sistemas modelo foram utilizados para simular a formação de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*, um dinâmico e outro estático, simulando trocadores de calor e tanques de armazenamento, respectivamente. Através do modelo estático foi possível obter contagens acima de 10^5 UFC por placa de aço inoxidável, mesmo após três ciclos de lavagem das placas em água estéril sob agitação.

Foi observado um efeito positivo na inativação de *P. fluorescens* em função do tempo de pré-plasma do sanificante. Exposições acima de 7 minutos foram capazes de produzir reduções superiores a dois ciclos logarítmicos na inativação do microrganismo.

Através de um planejamento experimental fatorial 2^3 foi demonstrado que as variáveis tempo de pré-plasma, tempo de exposição ao plasma e potência do plasma apresentaram efeitos positivos na inativação de *Pseudomonas fluorescens*. O tempo de exposição (min.) apresentou o maior efeito na destruição da bactéria; mas sendo um pouco superior à potência do plasma (w).

ABSTRACT

One of the problems that food industry is facing is the milk recontamination through biofilms formation on storage tanks and heat exchanger.

The technology of sterilization for materials through gas plasma has been used with success for surgical, ophthalmic and dentistry equipment.

The goals of this work was to evaluate the efficiency of a gas plasma sterilization system on *Pseudomonas fluorescens* cells adhered on stainless steel plates using milk as substrate. Time of pre plasma, plasma exposition and potency (Watts) were evaluated as independent variables on cell destruction.

The stainless steel plates were submitted to gas plasma treatment originated from a commercial product composed of peracetic acid, hydrogen peroxide and acetic acid.

Two model systems were used to simulate a biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens*, one dynamic and one static, in order to simulate heat exchangers and storage tanks, respectively. Through static model it was possible to get counts over 10^5 UFC/plate after washing three times using sterile water under stirring conditions.

It was observed a positive effect on *P. fluorescens* inactivation by pre-plasma in a time dependent way. Expositions over seven minutes were capable to produce reductions higher than two logarithmic cycles on microorganism inactivation.

A 2^3 factorial design indicated that the pre-plasma time, time exposition and potency showed positive effects on *Pseudomonas fluorescens* inactivation. Time exposition (min) was the most effective variable on bacteria destruction, being a little higher than plasma potency (w).

ÍNDICE

1	Índice de Tabelas _____	ix
2	Índice de Figuras _____	x
3	Introdução _____	1
4	Objetivos _____	3
5	Revisão Bibliográfica _____	4
5.1	Biofilmes na Indústria de alimentos _____	4
5.2	Mecanismo de Formação do Biofilme _____	7
5.3	Sanificantes e sua Eficiência na Desativação e Remoção de Biofilmes _____	10
5.4	Uso de Plasma na Inativação de Biofilmes _____	15
5.5	Modelos Experimentais na Formação do Biofilme _____	25
5.6	Características do Microrganismo _____	27
6	Material e Métodos _____	29
6.1	Preparo do Inóculo _____	29
6.2	Placas de Aço Inoxidável _____	29
6.3	Curva de Crescimento Bacteriano _____	30
6.4	Formação do Biofilme _____	30
6.4.1	Modelo Estático _____	30
6.4.2	Modelo Dinâmico _____	31
6.4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura _____	32
6.5	Esterilização a Plasma _____	33
6.5.1	Sistema de Esterilização a Plasma por Descarga de Rádio Frequência _____	33
6.5.2	Preparo dos Bioindicadores _____	35
6.5.3	Verificação da Efetividade dos Métodos de Esterilização _____	35
6.5.4	Processamento _____	36
6.5.5	Verificação da Uniformidade de Destruição do Plasma _____	37

6.5.6	Planejamento Fatorial 2^2	38
6.5.7	Efeito do Tempo de Pré-plasma	39
6.5.8	Planejamento Fatorial 2^3	39
7	Resultados e Discussão	41
7.1	Determinação das condições ótimas de temperatura e concentração do leite para crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	41
7.2	Formação do biofilme	45
7.2.1	Modelo estático	45
7.2.2	Modelo dinâmico	50
7.3	Esterilização a Plasma	50
7.3.1	Verificação da Uniformidade de Destruição Bacteriana pelo Plasma no Interior da Câmara	50
7.3.2	Planejamento Fatorial 2^2	52
7.3.3	Efeito do Tempo de Pré-plasma	55
7.3.4	Planejamento Fatorial 2^3	57
8	Conclusões	61
9	Referências Bibliográficas	62

1 Índice de Tabelas

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes. _____	38
Tabela 2: Níveis das variáveis independentes. _____	40
Tabela 3: Crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> a 30° C em leite reconstituído a 12% (24 h). _____	41
Tabela 4: Crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> a 23° C em leite reconstituído a 12% (24 h). _____	42
Tabela 5: Crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> a 30° C em leite reconstituído a 1% (24h). _____	42
Tabela 6: Crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> a 23° C em leite reconstituído a 1% (24h). _____	43
Tabela 7: Avaliação de destruição das bactérias pelo plasma em diferentes posições na câmara em função do numero de reduções decimais. ____	51
Tabela 8: Níveis utilizados para as variáveis independentes codificados (+1 –1) e número de reduções decimais (NRD) obtidos na população de <i>P. fluorescens</i> . _____	53
Tabela 9: Análise dos efeitos lineares da potência e tempo de exposição ao plasma no número de reduções decimais (NRD) de <i>P. fluorescens</i> . ____	54
Tabela 10: Análise dos efeitos da potência, tempo de exposição ao plasma e tempo de pré-plasma no número de reduções decimais (NRD) de <i>P. fluorescens</i> . _____	58
Tabela 11: Análise dos efeitos lineares da potência, tempo de exposição ao plasma e tempo de pré-plasma no número de reduções decimais (NRD) de <i>P. fluorescens</i> . _____	59

2 Índice de Figuras

Figura 1: a) Representação de espécies ativadas de oxigênio produzidas no plasma atacando paredes das células do microrganismo _____	16
Figura 2: Diagrama esquemático do sistema de esterilização por descarga de rádio freqüência. _____	33
Figura 3: Diagrama esquemático do protótipo do esterilizador a plasma de descarga por rádio freqüência. _____	34
Figura 4: Posições das amostras na câmara _____	37
Figura 5: Curvas de crescimento da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> _____	44
Figura 6: contagem de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em leite, nas águas de enxágüe e nas placas de aço inoxidável no modelo estático _____	46
Figura 7: Micrografia de colônias de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em resíduo de leite sob placa de aço inoxidável _____	47
Figura 8: Colônias de <i>Pseudomonas fluorescens</i> aderidas à placa de aço inoxidável _____	48
Figura 10: Avaliação do efeito do tempo do gás de Proxitane® na inativação de <i>P. fluorescens</i> . _____	56

3 Introdução

Muitas contaminações ou recontaminações ocorrem em indústrias de diferentes tipos de alimentos, entre as quais está a indústria de processamento de leite e seus derivados. Grande parte destes problemas está diretamente ligada à formação de biofilmes dentro da linha de processamento, onde a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, que faz parte da microbiota do leite, é um dos microrganismos associados a este problema. O biofilme é descrito como um grupo de bactérias que consegue colonizar uma superfície e multiplicar-se nas condições e nutrientes encontrados nos próprios componentes dos alimentos que estão sendo processados (Hood & Zottola, 1997).

Os maiores problemas de contaminação registrados nas indústrias de alimentos estão relacionados às indústrias de leite, de carne bovina e de aves. A utilização do calor através da pasteurização é uma das maneiras de inativar a maioria dos microrganismos em leite cru, porém, falhas de processamento nesta fase, como por exemplo o erro na aplicação do binômio tempo x temperatura, acaba gerando uma contaminação por bactérias no produto final ou leva à formação de biofilmes que terão a mesma consequência, posteriormente. Este tipo de contaminação, além de ser considerada o fator limitante para manter a qualidade de produtos de laticínio, é também um importante fator comercial e de segurança nestas indústrias, assim como para a saúde pública.

Desta maneira, muitas substâncias esterilizantes vêm sendo estudadas na forma de gás plasma, considerado no momento como um promissor meio de esterilização. Este plasma vem sendo considerado por muitos autores como o quarto estado da matéria, onde os outros três estados são sólido, líquido e gasoso. O plasma é definido com uma nuvem reativa de íons, elétrons e partículas neutras (Crow & Smith, 1995 e Stoffels *et al*, 1995). Este pode ser formado a partir da exposição dos sanificantes utilizados à uma descarga elétrica, magnética ou de microondas. A utilização de gás plasma como forma de esterilização de equipamentos e utensílios tem despertado o interesse de pesquisadores devido a alguns fatores positivos de seu uso, tais como a utilização de baixas temperaturas,

a rapidez em que o ciclo para a esterilização acontece, não desenvolver resíduos tóxicos ou cancerígenos e não provocar corrosão aos instrumentos esterilizados.

4 Objetivos

Objetivo principal:

- Avaliar a eficiência de um protótipo de esterilizador a gás plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens* aderidas a placas de aço inoxidável.

Outros objetivos:

1. Determinar os parâmetros ótimos de temperatura e concentração de leite para crescimento de *Pseudomonas fluorescens*.
2. Determinar o tempo e temperatura ideal para a formação do biofilme de *Pseudomonas fluorescens* em placas de aço inoxidável em sistema estático e dinâmico.
3. Avaliar a distribuição de gás plasma no interior de um esterilizador piloto.
4. Avaliar os efeitos do tempo de pré-plasma, potência e tempo de exposição ao gás plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens*.

5 Revisão Bibliográfica

5.1 Biofilmes na Indústria de alimentos

Devido aos problemas vinculados à formação de biofilmes, seu desprendimento e contaminação dos alimentos processados, os mesmos vêm sendo estudados com muito interesse por vários pesquisadores (Wirtanen *et al.*, 1996; Gândara, 1996; Hood & Zottola, 1997; Wong, 1998). A colonização em tanques de armazenamento do leite, adesão nos trocadores de calor e adesão de esporos na superfície de embalagens são alguns exemplos de problemas que também estão ligados aos biofilmes sob superfícies, um ponto crítico na indústria de laticínios (Kirtley & Mc Guire, 1989). Quando estes biofilmes são desprendidos da superfície do equipamento trazem como consequência o aparecimento de doenças infecciosas nos consumidores e o encurtamento da vida de prateleira do produto, o que acaba resultando em perdas econômicas para os produtores e consumidores.

A primeira publicação que descreve biofilmes foi escrita por Zobell em 1943, onde o autor iniciou estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios principalmente e em diferentes tipos de superfícies que incluíam vidro, metal e plástico que estavam submersas (citado por Kumar & Anand, 1998; Pontefract, 1991). Biofilme é descrito como um grupo de bactérias que conseguem colonizar uma superfície e multiplicar-se, nas condições e nutrientes encontrados nos próprios componentes dos alimentos que estão sendo processados.

Um biofilme não inclui somente a colônia de bactérias, mas todo o material composto por substâncias extracelulares poliméricas (SEP) produzidas na superfície e os nutrientes capturados para a formação da matriz (Hood & Zottola, 1997). O material extracelular é geralmente formado por compostos polissacarídicos e glicoproteínas. Estes polissacarídeos podem ajudar a capturar nutrientes e promover proteção física para o microrganismo aderido, após o biofilme formado.

Nas contaminações que geram problemas para as indústrias de leite, carne e aves, estão as provocadas por *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O 157: H7, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e *Lactobacillus curvatus* (Wirtanen *et al.*, 1996; Wong, 1998).

Wong (1998) realizou experiências para observar a adesão e a formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em dois tipos de superfícies: o aço inoxidável, acabamento nº 4, tipo 304 e borracha buna-n. O principal alimento utilizado foi o leite cru, já que este é rico em nutrientes e assim propicia um crescimento apropriado do microrganismo e meio PBS como padrão para comparação. O autor observou que as proteínas do leite geraram uma redução na adesão quando comparado ao crescimento rápido no meio PBS, e que a presença de lactose não interferia nessa adesão. O autor concluiu que apesar do leite ou algum de seus componentes reduzir o grau de adesão do biofilme, as sujidades ou resíduos dos mesmos em locais que não foram adequadamente limpos, acabam abrigando células de bactérias que irão multiplicar-se e aderir-se às superfícies formando biofilmes.

No mesmo trabalho, Wong (1998) estudou a recontaminação em uma linha de processamento de queijo Cheddar por *Lactobacillus curvatus* mesmo após a limpeza e sanitização do equipamento. Para isto, foram acopladas placas de aço inoxidável em vários pontos da linha de processamento que foram utilizadas como superfícies de adesão pelos microrganismos existentes na cultura utilizada. Após o primeiro processamento, a primeira série de placas foi retirada para a contagem e foram realizados o procedimento de limpeza e sanitização, onde novas placas foram inseridas nos mesmos locais anteriores. Um novo ciclo de processamento foi realizado sem acrescentar a cultura, e após o procedimento foi feita uma nova contagem. Esta contagem demonstrou a recontaminação no processamento, justificando assim novos estudos para eliminar esta contaminação.

A utilização do calor através da pasteurização é uma das maneiras de inativar a maioria dos microrganismos patogênicos em leite cru, porém falhas de

processamento nesta fase, como por exemplo o erro na aplicação do binômio tempo x temperatura, acaba gerando uma contaminação por bactérias no produto final ou a formação de biofilmes que terão a mesma consequência, posteriormente. Algumas bactérias específicas envolvidas na contaminação do leite são: *Pseudomonas* spp, *Lactobacillus* spp, *Enterococcus* spp, *Bacillus* spp e coliformes.

Austin & Bergeron (1995), através de observações em microscópio eletrônico de varredura, constataram que em linhas de processamento de leite que utilizavam dois tipos de materiais diferentes, a contaminação ocorria após a pasteurização, devido a adesão de microrganismo em diferentes componentes dos equipamentos. Esta adesão era facilitada pela presença de fendas na superfície dos materiais e pela deficiência da limpeza CIP utilizada. Este tipo de contaminação além de ser considerado o fator limitante para manter a qualidade de produtos de laticínio é também um importante fator comercial e de segurança nestas indústrias.

Assim, é necessário o emprego de procedimentos de sanitização para inativar a maioria dos microrganismos contaminantes que não foram removidos da superfície dos equipamentos na limpeza com detergentes.

Porém, mesmo sendo prejudiciais em inúmeros processos e locais, os biofilmes são necessários para a realização de outros processos, como por exemplo, na produção de vinagre, onde as espécies de microrganismos utilizados são *Acetobacter* e *Gluconobacter* e também na área ambiental como é a descontaminação e limpeza de águas que contenham resíduos antes que estas sejam lançadas novamente a córregos e rios (Zottola & Sasahara, 1994). Biofilmes tem também recebido considerável atenção do ponto de vista da biorremediação de vários efluentes industriais (Sarnaik & Kanekar, 1995; Nigam & Marchant, 1995; Nigam *et al.*, 1996; citados por: Kumar & Amand, 1998).

A grande dificuldade para combater os biofilmes é devido a existência das SEPs (substâncias poliméricas extracelular). Estas substâncias atuam como barreira de proteção frente aos agentes de limpeza e sanitização. Para evitar a formação destes biofilmes é recomendada a utilização de medidas preventivas

que minimizem as condições favoráveis de crescimento e multiplicação destes microrganismos. Isto inclui: um bom design dos equipamentos, seus componentes e tubulações; escolha do material dos equipamentos, correta construção e automação dos processos.

As abordagens de pesquisas para apontar soluções nas diferentes etapas do processamento que poderiam evitar a formação de biofilme poderão representar um avanço para a indústria alimentícia. Na falta delas, as técnicas para a remoção eficiente dos biofilmes se tornam grandes aliadas na eliminação do problema.

5.2 Mecanismo de Formação do Biofilme

A formação do biofilme é um fenômeno complexo que inclui diferentes etapas, variando de duas até cinco (Marshall *et al.*, 1971; Characklis & Cooksey, 1983; Lawrence *et al.*, 1987; Busscher & Weerkamp, 1987; Notermans *et al.*, 1990).

Os de duas e três etapas são os mecanismos mais aceitos de adesão das células de bactérias em superfícies sólidas (Hood & Zottola, 1995). Neste modelo de duas etapas, descrito por Marshall *et al.* (1971), na primeira etapa as bactérias presentes no meio são transportadas perto o suficiente da superfície para poderem ser adsorvidas em direção à mesma. Esta etapa é considerada reversível, já que a bactéria pode ser removida através de uma simples lavagem. Na segunda etapa, uma vez adsorvida a bactéria, o processo de formação é tempo-dependente, isto é, quanto mais tempo se passar, mais aderidas à superfície às bactérias estarão. Esta etapa envolve a produção da substância extracelular polimérica (SEP) que funciona como âncora da bactéria na superfície. Esta etapa é irreversível, já que as bactérias encontraram-se em condições propícias para sua multiplicação, aderindo-se fortemente à superfície, multiplicando-se e formando inúmeras camadas que dificultam a remoção.

O modelo de três etapas proposto por Busscher & Weerkamp (1987) aborda o processo em termos de distância entre as bactérias e a superfície. Para

distâncias acima de 50 nm, apenas forças fracas operam e assim a adesão é reversível. Quando a distância se aproxima a 20 nm, forças fracas e eletrostáticas estão operando. Esta etapa pode ser reversível, mas por ser também tempo-dependente pode acabar tornando-se irreversível. A terceira etapa ocorre em distâncias abaixo de 15 nm, onde forças eletrostáticas e de van der Waals começam a agir e há a produção das SEPs que conduzem a uma adesão irreversível. Em ambos os modelos, a etapa final depende da habilidade do microrganismo de produzir o material aderente, as SEPs de possuir algum outro sistema próprio que ajude a adesão como fímbrias ou flagelos. Outras características bacterianas como a carga elétrica superficial, existência de flagelos e hidrofobicidade também podem estar relacionadas com a adesão destas bactérias em superfícies (Elortondo *et al.* 1999).

Dados de experimentos realizados por Sasahara & Zottola (1993), mostraram que a presença de uma colônia primária produtora de SEP, neste caso a bactéria *Pseudomonas fragi*, ajudou adesão da colônia de *Listeria monocytogenes*.

O biofilme pode ser formado de maneira estática ou dinâmica (Stone & Zottola, 1985b; Wirtanen & Mattila-Sandholm, 1993; Gândara, 1995).

Stone e Zottola (1985b) realizaram um estudo com *Pseudomonas fragi*, bactéria produtora de fímbrias. Foi utilizado para o crescimento bacteriano leite em pó desnatado reconstituído a 10% esterilizado a 100⁰C por 30 minutos. A adesão dinâmica foi feita através da agitação de um béquer de aço inoxidável, onde nas extremidades foram colocadas placas de aço inoxidável 304 com acabamento n^o 4, onde foi acrescentado 1 litro do leite inoculado. Este béquer foi colocado dentro de um banho-maria giratório mantido durante 28 h a 25⁰C e velocidade de 100 rpm. Em tempos pré-determinados duas placas foram sendo retiradas até o tempo total para serem observadas através de microscopia eletrônica de varredura, assim como 1 mL do leite, para a realização da contagem da população final nestes tempos.

A adesão estática ocorreu através da inoculação das placas de aço inoxidável que ficaram dentro de placas de petri esterilizadas, inoculadas com o

mesmo leite inoculado utilizado para a adesão dinâmica. Estas placas foram colocadas em ambiente com temperatura controlada durante 28 h a 25⁰C. Duas placas de aço inoxidável foram sendo retiradas a cada tempo pré-determinado para serem observadas através da microscopia eletrônica de varredura e 1 mL do leite para que fosse determinada a população do leite nestes mesmos tempos.

Assim, após a microscopia eletrônica de varredura e as contagens, duas curvas de crescimento foram construídas onde os autores puderam observar que a curva de crescimento dinâmico teve uma razão de crescimento acima do crescimento estacionário. O tempo de geração do crescimento dinâmico foi de 67,8 minutos e o estacionário 85,5 minutos. Desta maneira os autores concluíram que a *Pseudomonas fragi* tem a habilidade de aderir-se ao aço inoxidável em ambos os tipo de adesão.

O aço inoxidável é uma das superfícies mais utilizadas em operações de processamento de alimentos devido a sua maior resistência à corrosão devido ao uso prolongado de sanificantes e a característica de poder facilmente ser tratado mecanicamente ou eletrostaticamente para tornar-se liso evitando a formação de biofilme (Dunsmore *et al.*, 1981). A boa qualidade e polimento da superfície são muito importantes para prevenir a formação de biofilmes.

Apesar da aparência plana e lisa deste material a olho nu, o mesmo é áspero quando visto ao microscópio possuindo fendas que podem abrigar células bacterianas. Isto foi demonstrado por Stone & Zottola (1985c) em um estudo realizado com vários tipos de placas de aço inoxidável com diferentes polimentos, onde dois tipos eram aqueles mais recomendados para a indústria de alimentos. A observação dos acabamentos foi feita com ajuda de um microscópio eletrônico de varredura, existindo uma grande diferença no número de fendas, aspereza e cor, o que afeta diretamente a capacidade de adesão dos microrganismos na superfície e formação de biofilmes.

Um dos tipos mais utilizados nas indústrias de processamento de alimentos é o aço inoxidável 304 com diferentes polimentos (Fatemi e Frank, 1999).

5.3 Sanificantes e sua Eficiência na Desativação e Remoção de Biofilmes

Os mecanismos clássicos de esterilização como o calor úmido de autoclaves ou o calor seco de fornos fazem com que todas as formas vivas sejam inativadas através da destruição do sistema metabólico celular o que inclui componentes enzimáticos(Moisán *et al.*, 2001).

Os sistemas de calor úmido requerem um conteúdo de água para produzir 100% de umidade relativa na temperatura de esterilização. A inativação de microrganismos por calor seco pode ser considerada primariamente um processo de oxidação(Moisán *et al.*, 2001).

Esterilização química é essencialmente um processo onde um material ou objeto é imerso em um esterilizante ou exposto a um sanificante em forma de vapor. Os sanificante mais utilizados neste tipo de esterilização são os glutaraldeídos, peróxido de hidrogênio e óxido de etileno. A atividade do óxido de etileno é devido à alcalinização de diferentes grupos químicos dos esporos ou células vegetativas (Moisan *et al.*, 2001).

O “sistema de limpeza” é a prática que mantêm todas as superfícies de contato com o alimento em condições de não alterar a qualidade do produto final após processamento. Este sistema inclui o uso de uma sequência específica de detergentes e sanificante de acordo com as características do material do equipamento e matéria-prima do produto (Dunsmore *et al.*, 1981).

Os princípios da limpeza enumerados por Swartling (1959) e Dunsmore *et al.* (1981) são: remoção dos resíduos de alimentos que possam vir a servir como nutrientes para qualquer bactéria remanescente na superfície; destruição ou remoção física de bactérias aderidas à superfície; armazenamento seguro de equipamentos durante o seu não uso e remover qualquer resíduo das soluções de limpeza que possam vir a contaminar posteriormente o alimento.

As linhas de processamento de leite são geralmente tratadas com procedimentos “Cleaning In Place” (CIP). Esta limpeza e sanitização são realizadas pela combinação de processos mecânicos, químicos e térmicos, onde usualmente estão incluídas as seguintes etapas: uma pré-lavagem com enxague

do resíduo grosso, uma lavagem com detergente, um enxague pós-detergência e a utilização de um sanificante. O tipo, as concentrações e formulações dos produtos químicos utilizados serão escolhidos de acordo com o tipo de resíduo, material utilizado na construção do equipamento, metodologia de limpeza e dureza da água (Stone & Zottola, 1985a).

Por ser constituído de uma parte solúvel em ácido (cálcio, fosfato e outros minerais), e uma parte solúvel em solução básica (gordura e proteínas), o resíduo de leite nos equipamentos deve ser limpo com um detergente alcalino seguido por um detergente ácido (Stone & Zottola, 1985a). Porém, a limitação do CIP é devida a aderência de proteínas desnaturadas, lipídios, sais naturais do leite ou bactérias nas superfícies de contato, com a conseqüente formação do biofilme (Passos, 1994; Austin & Bergeron, 1995).

Segundo Moisan *et al.* (2001) um sanificante para ser considerado ideal deverá promover: um tempo de esterilização mais curto ou equivalente do atual método mais utilizado em algumas áreas, como por exemplo, autoclaves ou métodos de calor seco (aproximadamente de 60 minutos); uma temperatura igual ou mais baixa utilizada com óxido de etileno (menor que 55⁰ C); a possibilidade de utilizar o método em uma variedade grande de objetos e materiais, e um menor risco operacional tanto para os operadores, paciente e materiais esterilizados.

Os sanificante são mais eficientes quando os compostos orgânicos são removidos anteriormente das superfícies com soluções alcalinas, agentes tensoativos, e quando são retirados resíduos minerais depositados na linha de processamento. A origem desta deposição ocorre devido às características da água utilizada durante a limpeza, a alguns componentes do próprio alimento e às próprias soluções de sanitização. Isto pode ser evitado com o uso de agentes complexantes como o EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) ou de soluções ácidas (Andrade & Macêdo, 1996).

Os sanificante têm sua atividade ligada à redução a níveis considerados seguros à saúde, de qualquer microrganismo deteriorador ou patógeno das superfícies dos equipamentos e utensílios que entrarão em contato com o alimento.

A solução de peróxido de hidrogênio tem sido muito utilizada como bactericida e possui propriedades esporocidas. Comercialmente existe a solução a 3% utilizada na esterilização de superfícies. A indústria de alimentos vem empregando este sanificante em forma de vapor para esterilizar materiais de embalagens, em conjunto com o envase asséptico, porém para a indústria de alimentos o resíduo que este tipo de sanificante deixa diminui a segurança do produto final sendo um risco para o consumidor tornando-se um ponto crítico de controle e preocupação (Purevdorj *et al.*, 2002).

Alguns materiais como o propileno e poliéster são susceptíveis a acumular resíduo do sanificante requerendo maior período de aeração pós-esterilização (Schneider, 1993).

A busca de sanificantes e técnicas de sanitização tornaram-se muito necessárias para a redução de custos, aumento da efetividade e garantia de quantidades baixas de resíduos tóxicos, e por este motivo o plasma tem se mostrado uma potente técnica de esterilização devido ao uso de baixa temperatura e a não geração de resíduos tóxicos mesmo quando o peróxido de hidrogênio é utilizado para a formação deste plasma (Purevdorj *et al.*, 2002).

O ácido peracético tem-se demonstrado um dos sanificante mais promissores para a indústria de alimentos devido a sua efetividade e outras vantagens como baixa toxicidade, não ser irritante, por possuir um amplo espectro de ação, inclusive sobre esporos bacterianos e agir em baixas temperaturas (Andrade & Macêdo, 1996). É um forte agente oxidante de componentes celulares dos microrganismos (Andrade & Macêdo, 1996) e está sendo um dos princípios ativos mais utilizados como componente de sanificantes nestes últimos anos frente a bactérias, bolores e leveduras (Fatemi e Frank, 1999). A atividade do ácido peracético, como outro sanificante, é mantida na presença de água dura e é levemente reduzida na presença de compostos orgânicos, como as proteínas dos alimentos, a gordura, o sangue, as fezes, entre outros. Ele é decomposto em oxigênio, água e ácido acético (Schneider, 1993).

Tem sido sugerido que o ácido peracético, quebra a ligação sulfidril (-SH) e disulfeto (-S-S) das enzimas celulares, quebrando importantes componentes da

membrana das bactérias (Davis *et al.*, 1980). Na indústria é utilizado em concentrações variando entre 300 e 700 mg/L, onde uma das características positivas deste tipo de sanificante é não atacar o aço inoxidável e ter eficiência elevada em temperaturas abaixo de 30°C em pH 2 e 4, sendo necessários de 10 a 15 minutos de contato com a superfície para que o ácido peracético atue (Microrganismos Patogênicos nos Alimentos, s.d.).

O uso de sanificantes deve então ser muito bem estudado antes do emprego nas indústrias, já que a sanitização é um ponto crítico e inúmeros fatores acabam influenciando no poder destes agentes frente aos biofilmes. A ação destes sanificantes pode variar de acordo com a natureza da superfície, o microrganismo presente, a idade do biofilme, a temperatura utilizada no procedimento de sanitização, dentre outros fatores.

Os fatores que influenciam a eficácia dos desinfetantes convencionais, depois da limpeza úmida, incluem concentração do desinfetante, tempo de contato, temperatura, pH, dureza da água, detergentes residuais, quantidade e tipo de material orgânico, tipo de superfície e espécies e níveis de microrganismos a serem inativados (União Internacional das sociedades de Microbiologia, APPCC, 1997). Vale a pena lembrar que não basta aumentar a concentração do sanificante já que muitas vezes este aumento pode acarretar um risco à saúde dos manipuladores, pode possibilitar um aumento residual no produto após o procedimento de sanitização, o que não é permitido, e aumentar o custo do produto, o que é uma desvantagem para a indústria e para o consumidor, e ainda uma elevada concentração química não necessariamente irá resultar no aumento de eficiência da sanitização (Kirtley & McGuire, 1989).

Assim, inúmeros autores têm se dedicado ao estudo destes sanificantes frente aos microrganismos mais comuns nas indústrias de alimentos para obterem parâmetros de sanitização efetivos promovendo a minimização da formação do biofilme (Mattila *et al.*, 1990; Andrade *et al.*, 1998; Lindsay & Holy, 1999, Petrus, 2000).

Mattila *et al.* (1990) demonstraram que bactérias isoladas de linhas de processamento de leite foram suscetíveis a sanificantes quando expostas na

forma de suspensão, porém foram resistentes aos mesmos reagentes quando estavam aderidas a uma superfície.

Lindsay & Holy (1999) estudaram o efeito de três sanificantes sob células de *Pseudomonas fluorescens* aderidas em placas de aço inoxidável. Os sanificantes utilizados foram gluconato de clorohexidina, um iodóforo e uma mistura de ácido peracético com peróxido de hidrogênio. As células aderidas foram testadas com cada um dos sanificantes nos tempos de exposição de 1, 3 e 5 minutos e a eficiência de cada sanificante foi verificada através de contagem em placas e através da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos mostraram que a mistura de ácido peracético com peróxido de hidrogênio após 1 minuto de exposição foi o sanificante mais efetivo frente às células aderidas, matando 99,5% destas.

Petrus (2000) através do processamento de uma bebida isotônica verificou a efetividade do uso de diferentes sanificantes em garrafas PET pré-processo, para melhorar o tempo de vida de prateleira deste produto já que a intenção era desenvolver esse produto sem o uso de qualquer conservante. O autor testou os seguintes sanificantes: Asepticper® (35% de peróxido de hidrogênio), Proxitane® 1512 (mistura de 15,6% de ácido peracético e 23,3% de peróxido de hidrogênio) e Vortexx® (mistura de 4,7% de ácido peracético e 6,1% de peróxido de hidrogênio) frente a uma contaminação de $2,6 \times 10^6$ UFC/mL da cultura de *Enterobacter aerogenes*. Os tempos de exposição e a concentração destes sanificantes foram variados, mas os resultados indicaram que o produto com melhor desempenho foi a solução feita a partir do produto Proxitane® 1512 na concentração de 0,3% de ácido peracético e 0,46% de peróxido de hidrogênio com o tempo de exposição por imersão de 3 segundos, sem deixar valores residuais do sanificante que pudessem ser prejudiciais ao produto ou à saúde do consumidor.

Vários trabalhos têm mostrado que o sucesso da utilização de um agente sanificante depende da sua habilidade de inativar e remover biofilmes (Bourion & Cerf, 1996; Frank & Chmielewski, 1997 e Fatemi & Frank, 1999).

Problemas podem ocorrer se células remanescentes de processos de limpeza deficientes são transferidas aos alimentos, uma vez que podem gerar

impactos negativos na qualidade de conservação e segurança deste alimento. Controlar a aderência destes microrganismos nas superfícies de contato é um importante passo para a obtenção de resultados positivos no processamento de alimentos.

Em adição aos problemas de limpeza e higiene de materiais, sabe-se que os biofilmes acabam acelerando a corrosão e a deterioração de materiais em equipamentos, sensores e detectores.

5.4 Uso de Plasma na Inativação de Biofilmes

As técnicas de esterilização hoje comumente utilizadas por terem inúmeras limitações acabaram favorecendo o desenvolvimento de técnicas alternativas como no caso da esterilização por gás plasma (Moisan *et al.*, 2001).

O uso de plasma oferece realmente uma alternativa como esterilização devido às propriedades intrínsecas deste meio. O método consiste em expor os microrganismos a espécies geradas por descargas elétricas em um gás. Estas espécies reativas desaparecem após alguns milésimos de segundos depois que estas descargas são interrompidas o que mostra que não é necessário tempo de ventilação e que portanto apresenta pouquíssimo perigo para o manipulador. As condições de operação da esterilização a plasma devem estar condicionadas a uma eficiente inativação dos microrganismos, enquanto minimiza os danos aos materiais submetidos ao método (Moisan *et al.*, 2001).

Os primeiros experimentos realizados com o plasma utilizaram gases inertes com o argônio e o hélio, porém na década de 70 iniciou-se o uso de halogênios como o cloro, bromo, iodo com o acréscimo de uma câmara esterilizadora aumentando assim a eficácia do processo. O primeiro artigo que descrevia o plasma como um agente esterilizante foi escrito por Menasi (1968), onde o autor utilizou argônio como gás formador do plasma. Na década de 80 muitos autores, como Jacobs & Lin (1987) usaram peróxido de hidrogênio em

solução aquosa de 1,8 mL para a concentração de 58% do volume para formar o plasma, aplicando descargas de rádio frequência (Moisan *et al.*, 2001).

O plasma é definido por alguns autores como uma nuvem de elétrons, íons, partículas neutras e radicais livres, gerada por ondas eletromagnéticas do tipo de rádio frequência, ou microondas, aplicadas ao gás sobre baixa pressão (Crow & Smith, 1995 e Stoffels *et al.*, 1995). Estas descargas quando agem sobre um gás, que na sua estrutura molecular contenha oxigênio, produzirá um plasma rico em espécies de oxigênio ativadas tais como: O^- , O_2^- e O_3^- (Stoffels *et al.*, 1995). Estas espécies, altamente reativas, se difundem por toda a câmara e consequentemente pelos materiais nela contida. Inicialmente o oxigênio ativado reagirá com as paredes das células dos microrganismos a serem eliminados, rompendo as ligações dos hidrocarbonetos. Em seguida as espécies atacam as partes internas das células até que toda a estrutura vital do microrganismo seja destruída (figura 1) (Chapman B.N *et al.*, 1980; Crow & Smith III, 1995). Alguns destes componentes celulares são as membranas celulares, enzimas e ácidos nucléicos (Vassal *et al.*, 1998).

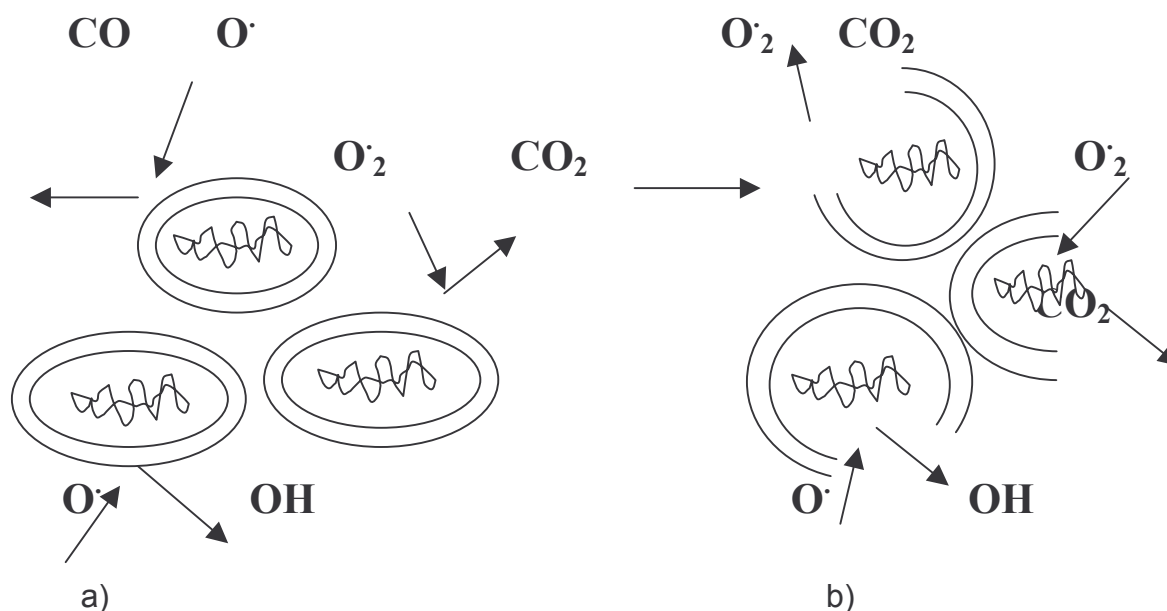


Figura 1: a) Representação de espécies ativadas de oxigênio produzidas no plasma atacando paredes das células do microrganismo. b) representação de espécies ativadas de oxigênio atacando as estruturas internas das células do microrganismo (Chau *et al.*, 1996).

A utilização do plasma como forma de esterilização de equipamentos e utensílios tem despertado o interesse de pesquisadores (Krebs *et al*, 1998 e Moisan *et al*, 2001) devido a alguns fatores positivos de seu uso, como:

- utilização de baixas temperaturas, o que reduz os custos do sistema;
- rapidez em que o ciclo acontece para realizar a esterilização;
- além de destruir bactérias e vírus dos instrumentos submetidos a este tipo de esterilização, também elimina da superfície esterilizada os compostos pirogênicos;
- não tem efeito sob as dimensões de materiais ou sobre as propriedades intrínsecas dos polímeros;
- elimina a necessidade de um período de aeração após o ciclo de esterilização;
- não desenvolve resíduos tóxicos ou cancerígenos e
- não provoca corrosão nos instrumentos esterilizados

O procedimento da esterilização a plasma está dividido em duas fases: a fase de difusão e a fase do plasma (Bathina *et al.*, 1998).

Alguns estudos mostram que podem haver três mecanismos envolvidos na inativação de microrganismos pela utilização do plasma: a-) destruição direta pela irradiação UV do material genético do microrganismo, b-) erosão do microrganismo, átomo por átomo, através da fotodesorção intrínseca à irradiação UV formando compostos voláteis combinando aos átomos do microrganismo e c-) erosão do microrganismo, átomo por átomo, através de desgaste formando compostos voláteis resultantes de combustão lenta por átomos de oxigênio ou radicais emanados do plasma (Moisan *et al.*, 2001).

O plasma vem sendo muito utilizado na área hospitalar, dentária e oftálmica onde é extremamente necessário que a esterilização dos instrumentos cirúrgicos como tesouras de aço inoxidável, instrumentos de irrigação e aspiração e cateteres que serão utilizados e introduzidos em pacientes que já se encontram debilitados por doenças e facilmente adquirirão uma infecção se entrarem em contato com qualquer microrganismo (Bialasiewicz *et al.*, 1995; Vassal *et al.*, 1998

e Bathina *et al.*, 1998). Além disto, os custos são mais baixos quando comparados aos métodos tradicionais de esterilização (Adler *et al.*, 1998).

O plasma pode ser formado por diversas substâncias (Ratner *et al.*, 1990) e gases como peróxido de hidrogênio, argônio, ácido peracético e até misturas destes sanificantes, que já existem comercialmente, como por exemplo, o Proxitane® 1512, mistura em equilíbrio de 15,6% de ácido peracético, 23,3% de peróxido de hidrogênio, ácido acético e água (Schneider, 1993; Petrus, 2000).

A esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio utiliza baixas temperaturas, umidade e gás plasma (Bathina *et al.*, 1998). Na fase de difusão o peróxido de hidrogênio é injetado aproximando-se dos materiais a serem esterilizados. Na segunda fase são criados os radicais livres hidroperoxil ($\text{HOO}\cdot$) e hidroxil ($\text{OH}\cdot$), que são os principais responsáveis pela esterilização (Crow & Smith, 1995 e Bathina *et al.*, 1998). O produto final destas reações é basicamente vapor de água e oxigênio, em pequenas quantidades que são bombeadas para o exterior pelo sistema de vácuo (Chau *et al.*, 1996).

Alguns fatores físicos externos como o tipo de gás utilizado, a intensidade do vácuo e a temperatura utilizada no momento da geração do plasma são variáveis importantes que podem determinar a efetividade deste processo (Schneider, 1993 e Purevdorj, *et al.*, 2002).

Desta maneira Purevdorj *et al.* (2002), realizaram experimentos para verificar comparativamente a destruição de células de *Escherichia coli*, utilizando plasma formado a partir de oxigênio e argônio. Segundo os autores, o aumento da potência das microondas formador do plasma aumenta a eficiência de destruição dos microrganismos.

Células bacterianas são higroscópicas e isto implica em que o vapor de água em ambientes gasosos consiga se condensar facilmente sobre suas superfícies. Desta mesma maneira vapores de peróxido de hidrogênio e ácido peracético podem condensar-se nos sítios de nucleação das células bacterianas, desde que a pressão e temperatura ambiente sejam propícias e consigam inativá-las (Moisan *et al.*, 2001).

O único cuidado que se deve sempre levar em conta é que não pode existir qualquer tipo de contaminação por material orgânico, como sangue, e / ou de cloreto de sódio, já que a presença destes prejudica a eficiência da esterilização. Porém por ter demonstrado ser uma técnica eficiente de esterilização, inúmeros autores estão desenvolvendo pesquisas nesta área (Scheider, 1993; Holler *et al.*, 1993; Bialasiewicz *et al.*, 1995; Gogolewski *et al.*, 1996; Southwood & Baxter, 1996; Chau *et al.*, 1996; Alfa *et al.*, 1997; Bryce *et al.*, 1997; Goldmam & Pruitt, 1998).

Vassal *et al.* (1998) após verificarem que os endoscópios eram veículos de transmissão de vários microrganismos intestinais, onde se inclui *Cryptosporidium parvum* realizaram experimentos para avaliar a efetividade da esterilização deste protozoário na forma de oocistos que após cresceram no intestino de ratos e aderidos nos endoscópios foram submetidos ao plasma. O processo de esterilização possuía 5 estágios que utilizavam 75 minutos para serem concluídos e o gás formador de plasma foi o peróxido de hidrogênio. Os autores observaram que o plasma foi efetivo em desinfetar os endoscópios com as fezes contaminadas com o protozoário.

Bialasiewicz *et al.* (1995) utilizaram como bactéria contaminante os esporos de *Bacillus pumilus* em diferentes instrumentos oftalmológicos. Estes instrumentos foram contaminados através de contato direto durante 10 minutos a temperatura ambiente em uma suspensão de sangue de carneiro e cloreto de sódio em diferentes concentrações. Os autores observaram que, em instrumentos complexos a redução logarítmica obtida foi abaixo de 2 ciclos, independente da suspensão contaminante utilizada. Em instrumentos simples, contaminados apenas com o sangue de carneiro, a redução logarítmica obtida foi abaixo de 4 ciclos e nos contaminados com cloreto de sódio a redução logarítmica obtida foi abaixo de 2. Assim os autores puderam verificar que o plasma não é efetivo à níveis desejáveis na presença de algum destes componentes nos instrumentos.

Bathina *et al.* (1998) realizaram experimentos para avaliar a segurança da utilização e a efetividade do gás plasma de peróxido de hidrogênio para esterilizar cateteres eletrofisiológicos. Estes cateteres foram reutilizados 5 vezes após a

esterilização a plasma realizada no equipamento Sterrad[®], utilizando uma rádio frequência de 400 Watts. O tempo gasto na totalização do ciclo foi de aproximadamente uma hora. Foram realizados experimentos com bactérias aeróbias e anaeróbias (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* e *C. sporogenes*) e com os vírus da poliomelite (hidrofílico), do vírus do herpes (lipofílico) e HIV-1 para testar a efetividade do procedimento. Para avaliar a possível formação de resíduos químicos, os cateteres foram enxaguados em água deionizada por 4 horas imediatamente após o processo de esterilização e a solução foi analisada através de cromatografia gasosa.

Os resultados indicaram que a bactéria mais resistente a esta técnica de esterilização foi o *Bacillus stearothermophilus*. Quanto aos vírus da poliomelite e do herpes conseguiu-se uma não apresentação destes após 20 minutos do ciclo de esterilização. E após 25 minutos o vírus do HIV – 1 foi completamente inativado. O único resíduo químico encontrado logo após a esterilização foi peróxido de hidrogênio na concentração de 0,22%.

Holler *et al.* (1993) utilizaram placas de aço inoxidável inoculados com diferentes bactérias, com diferentes resistências, entre as quais estavam *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Aspergillus niger*. Estes microrganismos foram preparados em diferentes soluções, como sangue de carneiro, e em diferentes concentrações de sal e ainda verificaram se a posição destas placas na câmara do plasma alteraria a efetividade do processo. O plasma utilizado foi peróxido de hidrogênio.

Após o experimento os autores verificaram que concentrações de sal iguais ou acima de 0,9% de cloreto de sódio reduziram a eficiência, assim como a presença de sangue de carneiro nas diferentes concentrações. Diferentes posições das placas dentro da câmara esterilizadora não é um fator que influencia diretamente o processo, nas condições deste experimento.

Existe porém a restrição de utilização de plasma em alguns materiais que possuam tubos longos e estreitos, como endoscópios flexíveis; em materiais que absorvem líquidos como o nylon e poliéster, naqueles compostos por fibras

vegetais, como o algodão, e em gases e produtos de papel (Schneider, 1993; Crow & Smith, 1995).

Schneider (1993) verificou a esterilização por plasma de diferentes materiais para embalar instrumentos cirúrgicos, aonde chegou a conclusão de que nenhum tipo de papel pode ser utilizado já que este tipo de material absorve o composto utilizado no plasma.

Chau *et al.* (1996) desenvolveram um equipamento para esterilização que utiliza plasma formado a partir de microondas. As bactérias utilizadas neste estudo foram *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus stearothermophilus*. Lâminas de vidro foram incubadas com 0,1 mL de cada cultura contendo a carga de 10^6 UFC/mL e foram secas à temperatura ambiente durante 3 horas dentro de placas de petri estéreis. O plasma utilizado era formado por N_2O , pressões de 40, 220 e 400 mTorr foram testados tempos de exposição de 2, 5, 10, 15 e 20 minutos. Após o procedimento de esterilização as placas retiradas da câmara eram imediatamente cobertas com agar nutriente e colocadas novamente dentro de placas de petri para permanecerem a 35^0 C durante 48 h para observar se haveria crescimento e assim verificar a eficiência do procedimento. Após este período a observação das lâminas em estereoscópios foram realizadas para avaliar a superfície. Os microrganismos presentes nas placas tratadas foram repassados para meios em placas em triplicata.

Os autores verificaram os seguintes resultados: a *Escherichia coli* já foi inativada a partir de 2 minutos de exposição na pressão de 40 mTorr; *Proteus vulgaris* a partir de 10 minutos de exposição, *Pseudomonas fluorescens* a partir de 15 minutos e *Bacillus stearothermophilus* a partir de 20 minutos de exposição. Assim, das células vegetativas, a *Pseudomonas fluorescens* foi a que mostrou maior resistência frente ao plasma enquanto que a *Escherichia coli* foi a mais sensível.

Bryce *et al.* (1997) avaliaram a eficiência de um sistema que combinava o uso de vapor de ácido peracético com plasma para obter a esterilização. O sistema é conhecido como AbTox Plazlyte Sterilization System[®]. Foram utilizadas várias espécies microbiológicas inoculadas em diferentes tipos de materiais

carreadores e materiais cirúrgicos que foram submetidos ao ciclo II e III do Sistema AbTox. O ciclo II durava duas horas e não era absorvente, utilizado para materiais sensíveis ao calor. O ciclo III durava cinco horas e era um ciclo absorvente.

A morte dos microrganismos foi mais efetiva em carreadores porosos de papel do que em materiais não porosos como o vidro, metal ou superfícies de plásticos e, quando existia qualquer resíduo de sais ou compostos orgânicos ocorreu falha na esterilização em ambos os ciclos.

Adler *et al.* (1998) desenvolveram o estudo para comparar três meios de esterilização que foram o plasma de peróxido de hidrogênio, solução de óxido de etileno e o vapor de formaldeído. Foram considerados primeiramente os custos de cada processo, sem considerar o tempo gasto por cada esterilizador, onde em ordem decrescente verificou-se o seguinte resultado: primeiro o óxido de etileno, seguido do plasma e por último o formaldeído. Quando foram considerados o tempo gasto em cada um dos esterilizadores, os autores observaram que custo/tempo beneficiou a utilização do plasma em todos os esterilizadores, já que o sistema a plasma tinha o ciclo mais curto e portanto teve o custo mais baixo.

Rutala *et al.* (1998) realizaram experimentos para comparar quatro tecnologias de esterilização com uso de baixas temperaturas, abaixo de 60°C: o óxido de etileno líquido com hidroclorofluorocarbono, um sistema de imersão com ácido peracético e dois processos de esterilização com plasma de peróxido de hidrogênio (Sterrad 100® e Sterrad 100s®). Os autores utilizaram como material de estudo suportes de aço inoxidável que foram inoculados com *Bacillus stearothermophilus*. Após o tratamento destes suportes com cada um dos sanificantes foram feitas culturas em Trypticase Soya Broth (TSB) com fenol vermelho e foram incubadas durante 14 dias a 55°C para confirmar se os compostos sanificantes foram efetivos. O esterilizador com óxido de etileno operava a uma temperatura de 54°C durante duas horas seguido por aeração durante 12 a 14 horas a 55°C. O Sistema Sterrad 100® operava com um vácuo de aproximadamente 0,5 mmHg. A rádio frequência utilizada na formação do plasma foi de 13,6 MHz. Os produtos finais formados após o ciclo foram água e oxigênio.

O ácido peracético estava a uma concentração de 0,2% que circulou pela câmara do sistema durante 12 minutos e os suportes foram enxaguados quatro vezes com água filtrada. O Sistema Sterrad 100S[®] utilizava em um ciclo dois estágios para a formação do plasma, um que era o estágio de difusão e outro o estágio do plasma propriamente dito. Os autores chegaram a conclusão que o Sterrad 100 S[®] foi significativamente superior ao Sterrad 100 e equivalente ao óxido de etileno com hidroclorofluorocarbono.

Outros dois tipos de esterilizadores a plasma foram utilizados em pesquisa: HP pb. Sterrad[®] (Jacobs & Lin, 1987), esterilizador este que utiliza peróxido de hidrogênio e o PA bp. Plazlyte[®] esterilizador que utiliza ácido peracético (Campbell & Moulton, 1995; Moisain *et al.*, 2001).

Gogolewski *et al.* (1996) verificaram que outras técnicas de esterilização como a vapor, água quente e irradiação com alta energia, acabam deformando o material plástico de implantes ou provocam degradação de outros tipos de polímeros. Desta maneira desenvolveram um trabalho para observar se a esterilização com gás plasma de diferentes composições afetava as propriedades moleculares ou mecânicas destes implantes além de ser ou não efetivo. Para estes experimentos foi utilizado o processador de plasma modelo 440 RF e os gases argônio, nitrogênio, oxigênio e dióxido de carbono.

O resultado obtido quanto à efetividade foi o seguinte: 100% das amostras tratadas com plasma de oxigênio ou dióxido de carbono foram esterilizadas após 15 minutos de exposição com o tratamento a 100W. Já no uso de plasma de nitrogênio e argônio apenas 70% das amostras tratadas foram esterilizadas após 15 ou 30 minutos de exposição. Quanto à alteração molecular, os autores puderam observar que nas condições utilizadas neste experimento não houve nenhuma diminuição ou aumento significativo no peso molecular de nenhuma das amostras e quando ocorreu houve um leve aumento no peso molecular dos polímeros. Todos os polímeros tratados com os 4 tipos de plasma com um tempo de exposição de 15 ou 30 minutos não mostraram qualquer evidência de mudança em suas propriedades mecânicas.

Goldmam & Pruitt (1998) compararam o efeito das esterilizações por radiação gama e gás plasma de peróxido de hidrogênio, à baixa temperatura, na estrutura e propriedades mecânicas de equipamentos ortopédicos de polietilenos de peso molecular ultra elevado. Outro ponto observado foi a oxidação deste material após ambos os métodos de esterilização. Todos os resultados foram comparados com polietilenos que não sofreram esterilização.

A radiação gama resultou em um aumento da densidade do material esterilizado que permaneceu neste estado por 6 meses. Por outro lado, a esterilização a plasma não causou alteração significativa da densidade e nenhuma alteração foi detectada com o tempo. A estrutura principal do polietileno foi afetada com a radiação gama enquanto que com tratamento de gás plasma isto não aconteceu. A oxidação que ocorreu durante a esterilização com radiação gama continuou a ocorrer mesmo após alguns meses da esterilização, enquanto que por gás plasma não aconteceu a oxidação do polietileno nem mesmo durante a esterilização ou após 6 meses.

Os autores Krebs *et al.*(1998) utilizaram *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* como bioindicadores para testar o peróxido de hidrogênio em forma de plasma no equipamento Sterrad 100[®]. O equipamento funcionou na fase do plasma durante 15 minutos com potência de 300 Watts. A temperatura da câmara estava em 45⁰ C +- 2⁰ C. Todas as bactérias foram aplicadas em três diferentes carreadores: tiras de papel 740 E, tubos usados para hemólise e tiras de polietileno. Todas as amostras após o experimento foram analisadas pela metodologia de fração negativa. Analisando todos os resultados, pode-se confirmar que o peróxido de hidrogênio no Sterrad 100[®] é extremamente esporocida e exibe uma consistente cinética de dose efeito. A inativação do *Bacillus subtilis* foi rapidamente alcançada, enquanto que o *Bacillus pumilus* e *Bacillus stearothermophilus*, apresentaram uma resistência maior. Notou-se ainda que o tipo de carreador não influenciou em nada nos resultados.

Assim a esterilização a plasma vem sendo considerada como uma alternativa para esterilização de materiais termosensíveis e que absorvem os

resíduos tóxicos e que hoje são esterilizados com óxido de etileno (Purevdorj *et al.*, 2002).

A tecnologia de esterilização a plasma vem sendo desenvolvida no Brasil para reduzir ainda mais os custos deste tipo de esterilização. Este tipo de esterilizador apresenta muitas vantagens e poderá ser adotada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos, levando a uma melhoria de qualidade dos produtos processados.

5.5 Modelos Experimentais na Formação do Biofilme

Vários sistemas modelo experimentais foram criados com o intuito de obter a formação ideal de biofilmes em diferentes superfícies (Stone & Zottola, 1985a e 1985b; Gândara, 1995; Macêdo *et al.*, 1996).

Macêdo *et al.* (1996) criaram um modelo para simular as condições de funcionamento de uma linha de processamento que utiliza o processo CIP de higienização, para avaliar assim a efetividade deste processo. O sistema foi montado utilizando lâminas de aço inoxidável que ficaram distribuídas em diferentes locais da tubulação. Estas lâminas foram utilizadas como superfície de crescimento dos biofilmes que após a contagem inicial foram submetidas ao contato dos sanificantes que circularam pelo sistema.

Stone & Zottola (1985a) verificaram a eficiência da sanitização de dois diferentes processos CIP em um modelo experimental que simulou uma linha de processamento de leite. A linha de processamento foi construída com tubulações de aço inoxidável 304, acabamento 4, onde foram fixadas placas pequenas do mesmo aço inoxidável, com um furo em um dos extremos, nos cotovelos das tubulações e nas seções T do plugue liga-desliga. Estas placas foram fixadas com um tipo especial de fita adesiva e amarradas com fio dental sem cera pelo orifício para que fossem mais facilmente retiradas após o procedimento de sanitização da tubulação. *Pseudomonas fragi* foi inoculada em 15 litros de leite em pó desnatado reconstituído a 10% que ficou circulando pelo sistema durante 8 horas. Nos tempos 30 minutos, 3 horas e meia, 4 horas e 7 horas e meia, placas foram

retiradas para serem observadas através microscopia eletrônica de varredura para quantificarem o número de células aderidas às placas. A cada nova batelada de placas, o sistema foi submetido aos processos de sanitização e o leite recirculado. Quando completadas os tempos estipulados, o procedimento de contagem de células foi repetido.

Os autores puderam verificar que quanto maior o intervalo de tempo entre uma sanitização e outra, maior foi o depósito de resíduos e assim maior foi a dificuldade de qualquer procedimento de sanitização para retirar possíveis biofilmes formados nas tubulações dos equipamentos.

Gândara (1995) desenvolveu seu trabalho baseado na formação de biofilme em placas de aço inoxidável, em um modelo experimental, onde o tratamento de limpeza CIP, utilizado em indústrias foi testado com hipoclorito de sódio 100 ppm como sanificante. As placas de aço inoxidável foram colocadas de maneira a ficarem suspensas, através de ganchos, dentro de jarras de vidro contendo leite como meio de crescimento a uma agitação de 500 rpm em banho-maria a 45⁰ C. A bactéria formadora do biofilme foi *Streptococcus thermophilus*.

De maneira asséptica foi acrescentado à cultura do microrganismo a este sistema, o qual foi mantido sob agitação por um período de 6h, simulando a continuidade do processo realizado em indústrias de leite. Amostras foram sendo retiradas em períodos de tempo diferentes para determinar o tempo ideal para a formação do biofilme.

Neste experimento as placas foram submetidas a um procedimento de limpeza e sanitização. A contagem final das bactérias de cada etapa deste experimento foi realizada através de inoculação em placas. A autora verificou que já havia início de adesão a partir de 3 horas inoculação, porém a maior adesão ocorreu no final das 6 horas. A reprodutividade do experimento só era conseguida quando todos os passos eram rigorosamente repetidos.

5.6 Características do Microrganismo

Pseudomonas fluorescens pertence à família das *Pseudomonadaceae*. Estas podem ser encontradas em diferentes ambientes como o solo, a água, os vegetais e seus produtos industrializados; a pele animal, os alimentos marinhos e utensílios, mas sem dúvida as fontes principais são o solo e a água.

As *Pseudomonas* spp são bastonetes Gram negativos, aeróbias, catalase e oxidase positivas, lactose negativas. Diversas cepas deste gênero estão relacionadas com a deterioração de alimentos refrigerados por serem psicotróficas, crescendo em temperaturas entre -5°C e 5°C , embora sua temperatura ótima varia entre 25°C e 30°C (Sneath *et al.*, 1986; Jay, 1994) e o seu crescimento é quase nulo em temperaturas acima de 43°C (Frazier & Westhoff, s.d). Devido a esta sua característica de crescer a baixas temperaturas, as *Pseudomonas* têm causado inúmeros problemas na indústria de laticínios, pois muitas espécies como a *Pseudomonas fluorescens* produzem enzimas termoresistentes que afetam a estabilidade e qualidade do leite, principalmente alterando as características organolépticas dos produtos (Criado *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 2000). Porém além do problema direto com o alimento o problema como este tipo de bactéria se torna mais amplo já que a maioria dos microrganismos patógenos que provocam problemas de infecção em hospitais derivam de espécies de bactérias originárias de alimentos. O risco de infecção vem essencialmente de bactérias que possuem um elevado potencial de adaptação. Todas as espécies deste gênero e especialmente aquelas presentes em abundância no meio ambiente como a *Pseudomonas fluorescens* possui esta característica de adaptação (Picot *et al.*, 2001).

A presença de bactérias psicotróficas no leite cru ou leite pasteurizado é comum devido à dificuldade de eliminá-las durante o processamento. A baixa temperatura de estocagem e constante agitação nos tanques acaba por aumentar o nível de oxigênio do leite o que favorece o crescimento destes microrganismos, onde *Pseudomonas* é o gênero que predomina (Stone & Zottola, 1985b).

As *Pseudomonas* possuem baixa resistência térmica e assim, quando encontradas em alimentos processados são indicadoras de contaminação pós-pasteurização.

A *Pseudomonas fluorescens* produz a enzima lipase que atua diretamente em triglicerídios resultando na rancificação destas gorduras que é o principal motivo da deterioração do leite. Esta bactéria é produtora de pigmentos fluorescentes amarelo-esverdeados, outra de suas características (Franco & Landgraf, 1996).

Algumas alterações causadas por outras cepas de *Pseudomonas* são o odor a batata no leite pela *Pseudomonas mucidolens*, a formação de pigmentos verdes ou azulados pela *Pseudomonas syncyanea* e a formação de uma limosidade superficial em alimentos refrigerados com alta atividade de água pela *Pseudomonas alcaligenes* (Franco & Landgraf, 1996).

As *Pseudomonas fluorescens* e *fragi* produzem alterações organolépticas em pescado devido à formação de compostos voláteis como a trimetilamina e ésteres (Franco & Landgraf, 1996). Esta constitui cerca de 60% e 80% da microbiota nas carcaças de aves frescas durante o seu congelamento e são facilmente isoladas de superfícies de equipamentos em que estas aves são processadas (Lindsay & Holy, 1999).

Chau *et al.* (1996) detectaram que a *Pseudomonas fluorescens* foi a mais resistente das células vegetativas testadas quando aplicado plasma como método de esterilização.

6 Material e Métodos

6.1 Preparo do Inóculo

Neste trabalho foi utilizada uma cultura de *Pseudomonas fluorescens* IB 2312 do Instituto Biológico de São Paulo. Foram inicialmente avaliados TSA (Triypyc Soy Agar, Merck) e NA (Agar Nutriente, Merck) para a escolha do melhor meio de cultura para utilizar na manutenção em tubos com rampa da cultura mãe. Optou-se finalmente pelo NA devido a melhores contagens finais.

A fim de avaliar as melhores temperaturas e concentração do leite para o crescimento do microrganismo, testes foram realizados em temperaturas de 23⁰C e 30⁰C, nos leites reconstituídos nas concentrações de 1% e 12% (p/p), onde a contagem final foi feita após o plaqueamento por superfície placas de TSA. Os resultados, expressados em UFC/mL, serviram para a obtenção dos parâmetros ótimos para o crescimento do microrganismo.

O inóculo foi preparado a partir de uma alçada da cultura mãe inoculada em um erlenmeyer contendo 20 mL de leite esterilizado (leite em pó Molico desnatado reconstituído a 12% p/p) e incubado em estufa, por um período total de 24 h à temperatura de 30⁰ C, temperatura e concentrações estas determinadas nos experimentos iniciais.

6.2 Placas de Aço Inoxidável

As placas de aço inoxidável foram confeccionadas a partir de uma chapa de aço inoxidável 304 com 2mm de espessura (doadas pela empresa Osmec, Campinas, SP). Estas foram cortadas em placas menores de 2 x 8 cm e polidas grana 180. Anteriormente ao uso as placas foram lavadas com solução alcalina (hidróxido de sódio 1% SYNTH, PM 40) e ácida (ácido nítrico 0,5% CHEMCO, PM 63,01) e esterilizadas em autoclave durante 15 minutos a 121⁰C.

6.3 Curva de Crescimento Bacteriano

Para a obtenção da curva de crescimento foi utilizada a seguinte metodologia: um erlenmeyer contendo 20 mL de leite esterilizado (leite em pó Molico desnatado reconstituído a 12% p/p) inoculado com uma alçada da cultura mãe e incubado em estufa, por um período total de 24 h à temperatura de 30⁰ C, temperatura esta determinada nos experimentos iniciais.

Amostras do leite foram retiradas nos intervalos de tempo pré-estipulados de 3, 6, 9, 12 e 24 h. As amostras foram plaqueadas em TSA e incubadas por 24h a 30⁰ C, onde os resultados foram expressos em UFC/ mL.

6.4 Formação do Biofilme

Foram avaliados dois sistemas modelo para a formação de biofilme nas placas de aço inoxidável: um estático e um dinâmico, simulando um tanque de estocagem de leite e uma linha de processamento contínuo, respectivamente.

6.4.1 Modelo Estático

Neste modelo, inoculou-se 1 mL do inoculo inicial feito no elermeyer (descrito no item 6.3) em um béquer de 2 L com o mesmo volume de leite reconstituído a 12%, fechado com material esterilizado, onde seis placas de aço inoxidável ficaram imersas por ganchos de aço inoxidável durante 96 horas à 30⁰C. Após este período, todas as placas foram submetidas a três enxágües consecutivos em água destilada estéril, para isto, estas placas foram colocadas em béqueres (sucessivamente) com 1,5 L sob agitação de 600 rpm por 5 minutos. Após este procedimento, as placas foram retiradas dos recipientes e deixadas para escorrer o excesso de água por 10 minutos dentro do fluxo laminar. A contagem de células aderidas nas placas foi realizada pelo método de swab, o qual consistiu em esfregar de maneira uniforme uma haste de plástico com

algodão estéril na superfície da placa de aço inoxidável com intuito de recuperar as bactérias aderidas na mesma e proceder a posterior contagem. Após este procedimento, a recuperação das bactérias da haste foi realizada utilizando um tubo de ensaio com 10 mL de solução de tampão fosfato e Tween 80. As demais diluições foram realizadas somente com tampão fosfato.

As contagens foram realizadas por superfície em placas descartáveis com TSA (Tryptic Soy Agar). Para cada diluição foram realizadas duplicatas das placas estas foram incubadas à temperatura 30°C durante 24 h e com os resultados obtidos foram realizadas médias e estes expressos em UCF/ mL.

6.4.2 Modelo Dinâmico

Seguindo o modelo utilizado por Gândara (1995), o leite em pó desnatado foi reconstituído a 12% (p/p), esterilizado e colocado em um recipiente cilíndrico de vidro (volume para 2 L, com 18 cm de diâmetro e 15 cm de altura) sob agitação constante (600 rpm), mantido em banho-maria na temperatura de 30⁰ C. Seis placas de aço inoxidável foram submetidas ao tratamento de limpeza com os detergentes alcalinos (hidróxido de sódio 1% SYNTH, PM 40) e ácido (ácido nítrico 0,5% CHEMCO, PM 63,01) e esterilização (em autoclave a 121⁰ C por 15 minutos) para depois serem penduradas por ganchos de aço inoxidável, de maneira a ficarem submersas no leite para que fosse simulada uma linha de processamento. A carga inicial inoculada no leite foi aproximadamente 10³ UFC/mL.

A cada intervalo de tempo predeterminado (6 ou 12 h conforme o experimento) duas placas foram retiradas para que fosse feito o acompanhamento da formação do biofilme. Após a retirada das placas do leite foram realizados três enxagues com 1,5 L de água destilada estéril por cinco minutos sob agitação (600rpm) para retirada de depósitos de leite ou células que estivessem aderidas de maneira fraca às placas. A contagem de células nas placas foi realizada através da metodologia de swab descrita no item 7.4.1.

6.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Seguindo a mesma metodologia de formação do biofilme do modelo estático do item 6.4.1, oito placas de aço inoxidável foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura preparadas segundo a metodologia de Tavares (2003) após as mesmas lavagens em água destilada para a remoção das bactérias aderidas de maneira fraca às placas e não possivelmente na forma de biofilme.

As placas de aço inoxidável foram mergulhadas em água estéril e em seguida deixadas por duas horas para fixação em glutaraldeído 2,0% em fosfato de sódio 0,1 M pH 7,13. Após duas lavagens de 15 minutos em tampão fosfato 0,1 M as placas foram submetidas a uma pós-fixação em Tetróxido de Ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M por uma hora. Duas novas lavagens em tampão fosfato foram feitas por 15 minutos para iniciar-se a desidratação alcoólica em série, que iniciou-se em solução de etanol 50% durante 8 horas e seguiu para duas soluções de etanol a 70% por 15 minutos, duas soluções de etanol 90% por 15 minutos, duas soluções de etanol 95% durante 15 minutos e em três soluções de etanol 100% durante 10 minutos.

Todas as amostras foram para o equipamento de CPD (Critical Point Dehydration) em meio de acetona para desidratação final para então serem montados os stubs e a metalização em 100s/40mA com ouro e realizada a observação no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL 5800LV (pressão variável de 0,3-30 KV).

6.5 Esterilização a Plasma

6.5.1 Sistema de Esterilização a Plasma por Descarga de Rádio Frequência

O esterilizador utilizado no estudo foi um protótipo construído pela Valithec Indústria e Comércio Ltda o qual estava em fase de desenvolvimento pela referida empresa com financiamento da FAPESP no programa FIPE.

O sistema de esterilização a plasma é formado por uma câmara de vácuo (reator), uma fonte de rádio frequência com acoplador de impedância e wattímetro direcional e um mecanismo de alimentação do material formador de plasma (figura2).

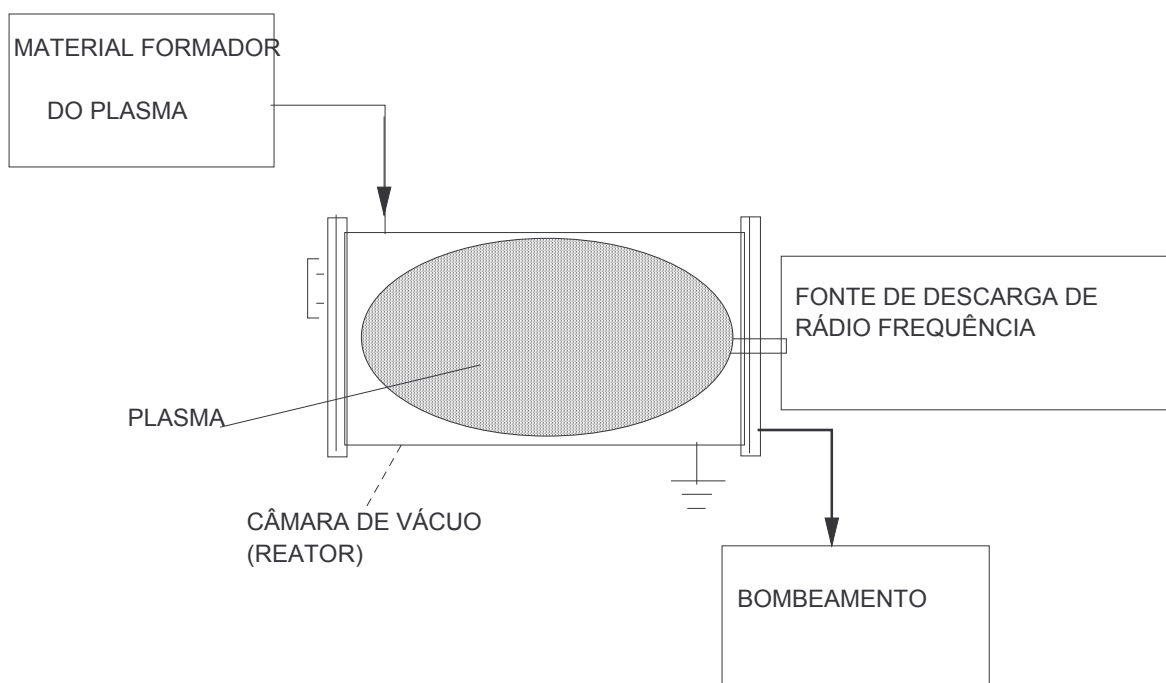


Figura 2: Diagrama esquemático do sistema de esterilização por descarga de rádio frequência.

O esterilizador é constituído por uma câmara de aço inoxidável 304 de 50 cm de diâmetro x 60 cm de comprimento local onde foram colocados os materiais a serem esterilizados, um sistema de alto vácuo com uma bomba mecânica de duplo estágio vazão 12m³/h e pressão de até 10⁻³ mBar um sistema de RF (0 a

500W de potência e frequência de 13.56 MHz) e um acoplador de impedância e wattímetro direcional.

O plasma do sanificante Proxitane[®] 1512 (mistura de 15,6% de ácido peracético e 23,3% de peróxido de hidrogênio) foi gerado no interior da câmara entre dois eletrodos cilíndricos concêntricos. O suporte dos materiais estava ligado eletricamente a um dos eletrodos. O sistema de injeção do sanificante foi constituído por um reservatório graduado conectado à câmara através de uma válvula agulha (figura 3).

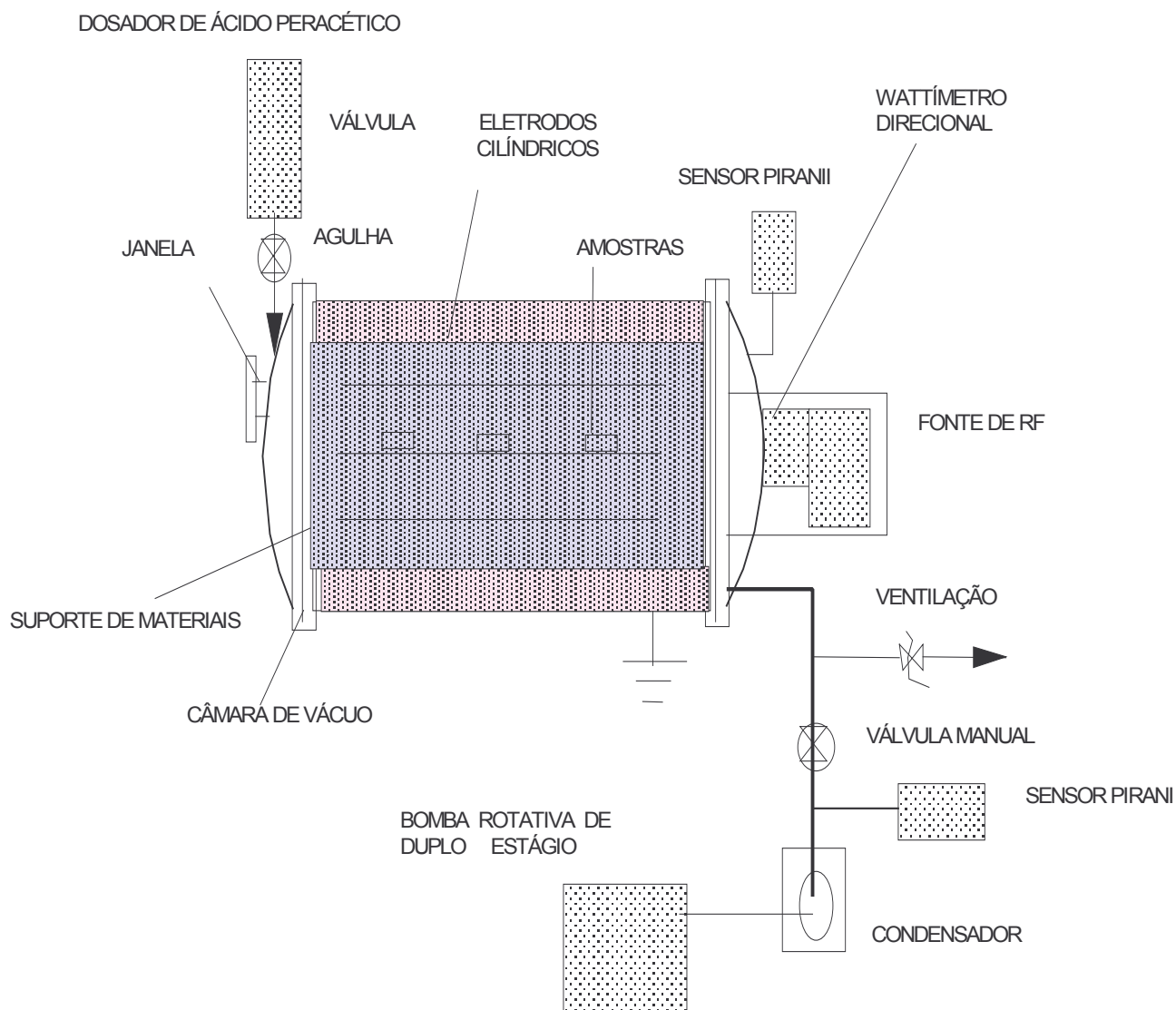


Figura 3: Diagrama esquemático do protótipo do esterilizador a plasma de descarga por rádio frequência.

6.5.2 Preparo dos Bioindicadores

Os bioindicadores utilizados para a avaliação da efetividade do esterilizador foram preparados a partir da cultura de *Pseudomonas fluorescens* em leite em pó reconstituído a 12% (p/p), que ficou em crescimento durante 24 h a 30⁰ C e diluído em série em dois tubos de água peptonada, para atingir uma população inicial de 1x10⁷ UFC/ mL. Foi espalhado 0,1 mL deste inoculo, de maneira uniforme sob as placas de aço inoxidável, tornando a população final dos bioindicadores de aproximadamente 1x10⁶ UFC/ mL. Estas placas eram deixadas para secar dentro de placas de petri estéreis à temperatura ambiente por 24h.

6.5.3 Verificação da Efetividade dos Métodos de Esterilização

Para todo o experimento em suas diferentes etapas foi utilizada a metodologia de swab e contagem em placas para avaliar a destruição da bactéria pelo plasma (efetividade do plasma). Este método consistiu em esfregar de maneira uniforme uma haste de plástico com algodão estéril na superfície da placa de aço inoxidável com intuito de recuperar as bactérias aderidas na mesma e proceder a posterior contagem. Após este procedimento, a recuperação das bactérias da haste foi realizada com solução de 0,250 mL do tampão fosfato 0,5 M (0,68 g/10 mL), 230 mL de água destilada e 0,23 g de Tween 80.

As contagens foram realizadas por superfície em placas descartáveis com TSA (Tryptic Soy Agar). O TSA foi preparado em garrafas de vidro com tampas de rosca com capacidade de 1 L, esterilizado em autoclave a 121⁰C por 15 minutos e depois espalhados nas placas de petri descartáveis.

Para cada diluição foram realizadas duplicatas das placas e estas foram incubadas à temperatura 30⁰C durante 24 h.

A eficiência de destruição das bactérias foi avaliada através do Número de Reduções decimais (NRD), calculado como segue: $NRD = \text{Log (UFC no controle)} -$

Log (UFC após a esterilização), sendo UFC o número de unidades formadoras de colônia encontradas em cada placa.

6.5.4 Processamento

A cada processo, três placas de bioindicadores foram colocadas dentro da câmara para avaliar o processo de esterilização. As placas foram colocadas sempre nas posições 3, 4 e 5 (Figura 4). Outras três placas foram usadas como controle para que a contagem e redução logarítmica fossem obtidas para cada processo.

Experimentos foram realizados utilizando o sanificante Proxitane® 1512 como material formador de plasma. O ciclo do processo foi formado pelas seguintes etapas:

A- Inicialmente foi feito vácuo na câmara para sua limpeza. Nos experimentos realizados foram suficientes dez minutos para atingir uma pressão menor que 6×10^{-2} mBar, utilizando bomba de vácuo mecânica. A pressão inicial deverá ser a mínima possível para obter a limpeza da câmara e maior difusão do gás através dos materiais a serem esterilizados.

B- Em seguida, o sanificante foi injetado e expandido no interior da câmara. A expansão deste leva a uma nova e maior pressão de equilíbrio, estabelecida em torno de 1 a 2 mBar.

C - O terceiro estágio corresponde a um período de espera denominado pré-plasma. Esse tempo depende da quantidade e do tipo do material a ser esterilizado.

D - O quarto estágio iniciou-se com a descarga elétrica formando o plasma. Inicialmente a pressão foi diminuída para 2×10^{-1} mBar para depois ser aplicada uma descarga elétrica de rádio frequência que gerou plasma.

E - O processo foi finalizado desligando a descarga e ventilando a câmara.

Após cada processo as placas foram retiradas da câmara de maneira asséptica e recolocadas em placas de petri estéreis para novamente serem levadas à câmara de fluxo laminar para realização da contagem de sobreviventes.

6.5.5 Verificação da Uniformidade de Destruição do Plasma

A verificação da uniformidade de destruição do plasma foi realizada colocando-se cinco placas estrategicamente distribuídas no interior da câmara, conforme a figura 4. Foram realizados três ensaios avaliando-se o número de reduções decimais sempre nas mesmas condições de operação do equipamento: potência 75W, tempo de pré-plasma de 4 minutos e tempo de processo no plasma de 10 minutos. As médias foram avaliadas através do teste de Tukey utilizando-se o STATISTICA (StatSoft, Inc.).

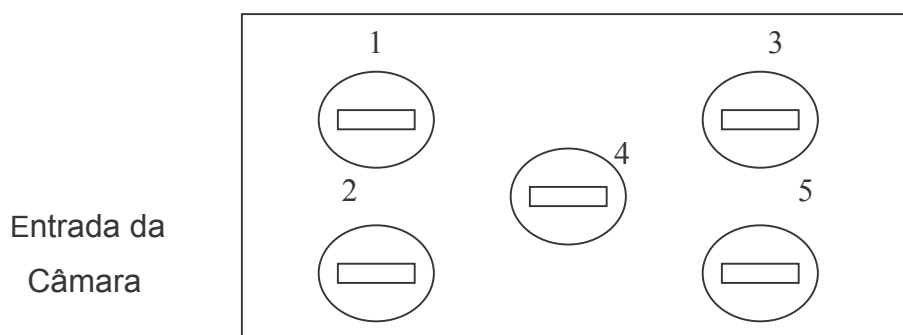


Figura 4: Posições das amostras na câmara (vista de topo)

6.5.6 Planejamento Fatorial 2²

Um planejamento fatorial 2² foi realizado a fim de estudar o efeito da potência e tempo de exposição ao plasma na inativação das células aderidas. As faixas escolhidas para as variáveis independentes foram baseadas em experimentos preliminares uma vez que o equipamento estava em fase de desenvolvimento e, além do pouco conhecimento do processo, havia uma limitação, a potência máxima de operação em 100 Watts. Sendo assim, foram determinadas as seguintes faixas de operação para potência entre 50W e 100W (-1 +1) e tempo de exposição ao plasma entre 5 e 15 minutos (-1 +1) . O ponto central foi realizado em triplicata. A variável de resposta foi o número de reduções decimais do microrganismo.

Neste estudo, após a obtenção do vácuo no interior da câmara (6×10^{-2} mBar), o sanificante (0,8 mL) foi injetado na mesma e o processo de formação do plasma iniciado imediatamente.

A Tabela 1 apresenta os níveis escolhidos para as variáveis independentes.

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes.

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Ponto</i>		
	<i>Nível -1</i>	<i>central</i>	<i>Nível 1</i>
Potência (W)	50	75	100
Tempo de exposição ao plasma (min.)	5'	10'	15'

A redução central rotacional composta foi realizada pela metodologia de Box *et al.* (1978). Os efeitos sinérgicos e antagônicos entre a potência e tempo de exposição ao plasma foram avaliados por meio do estudo da tabela de efeitos e interações gerados pelo programa STATISTICA (StatSoft, Inc.).

6.5.7 Efeito do Tempo de Pré-plasma

Foi avaliado nesta etapa o efeito do tempo de exposição ao sanificante durante o tempo de difusão (antes da descarga para a formação do gás plasma) dentro da câmara sob as células aderidas às placas. Três placas do bioindicador foram colocadas no interior da câmara, nas posições 3, 4 e 5 (figura 4) e 0,8 mL do sanificante foi injetado após a obtenção do vácuo (6×10^{-2} mBar) no interior da mesma. Foram avaliados os tempos de residência de 3, 5, 7 e 10 minutos. Decorridos os tempos de tratamentos, a câmara foi aberta e a contagem de sobreviventes foi realizada nas placas submetidas aos processos. Placas controle (sem o referido tratamento) foram preparadas para o cálculo do número de reduções logarítmicas.

6.5.8 Planejamento Fatorial 2^3

Um planejamento experimental fatorial 2^3 foi realizado com a finalidade de estudar o efeito das variáveis: tempo de pré-plasma, tempo de exposição e potência do plasma no número de reduções logarítmicas do microrganismo. A tabela 2 apresenta os níveis utilizados para as variáveis independentes (+1 –1). O ponto central foi realizado em triplicata. A variável de resposta foi o número de reduções decimais.

Neste estudo, após a obtenção do vácuo no interior da câmara (6×10^{-2} mBar), o sanificante (0,8 mL) foi injetado na mesma e o tempo de pré-plasma para cada condição era então aplicado e posteriormente iniciada a descarga para a formação do gás plasma.

Tabela 2: Níveis das variáveis independentes.

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Nível -1</i>	<i>Ponto central</i>	<i>Nível 1</i>
Potência (w)	50	75	100
Tempo de exposição ao gás plasma (min.)	5'	10'	15'
Tempo de pré-plasma (min.)	3'	4'	5'

A redução central rotacional composta foi realizada pela metodologia de Box *et al.* (1978). Os efeitos sinérgicos e antagônicos, entre a potência e tempo de exposição ao plasma foram avaliados por meio do estudo da tabela de efeitos e interações gerados pelo programa STATISTICA (StatSoft, Inc.).

7 Resultados e Discussão

7.1 Determinação das condições ótimas de temperatura e concentração do leite para crescimento de *Pseudomonas fluorescens*

As tabelas 3, 4, 5 e 6 apresentam o crescimento em 24 h de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes concentrações de reconstituição do leite em pó desnatado a 1% e 12% e a temperaturas de 23^o C e 30^o C.

Tabela 3: Crescimento de *Pseudomonas fluorescens* a 30^o C em leite reconstituído a 12% (24 h).

	Concentração do leite (%)	Temperatura (^oC)	Contagem (UFC/ mL)
Experimento 1	12%	30 ^o C	1,94E+08
Experimento 2	12%	30 ^o C	1,13E+08
Experimento 3	12%	30 ^o C	2,90E+08
Experimento 4	12%	30 ^o C	1,90E+09
Média			6,24E+08

Tabela 4: Crescimento de *Pseudomonas fluorescens* a 23⁰ C em leite reconstituído a 12% (24 h).

	Concentração do leite (%)	Temperatura (⁰C)	Contagem (UFC/ mL)
Experimento 1	12%	23 ⁰ C	1,88E+08
Experimento 2	12%	23 ⁰ C	3,15E+08
Experimento 3	12%	23 ⁰ C	8,00E+07
Experimento 4	12%	23 ⁰ C	3,15E+08
Média			2,25E+08

Tabela 5: Crescimento de *Pseudomonas fluorescens* a 30⁰ C em leite reconstituído a 1% (24h).

	Concentração do leite (%)	Temperatura (⁰C)	Contagem (UFC/ mL)
Experimento 1	1%	30 ⁰ C	1,00E+05
Experimento 2	1%	30 ⁰ C	4,40E+07
Experimento 3	1%	30 ⁰ C	2,55E+07
Média			2,32E+07

Tabela 6: Crescimento de *Pseudomonas fluorescens* a 23⁰ C em leite reconstituído a 1% (24h).

	Concentração do leite (%)	Temperatura (⁰C)	Contagem (UFC/ mL)
Experimento 1	1%	23 ⁰ C	2,69E+07
Experimento 2	1%	23 ⁰ C	1,09E+07
Experimento 3	1%	23 ⁰ C	1,95E+07
Média			1,91E+07

Observando-se as tabelas 3 e 4 podemos notar que as contagens de *Pseudomonas fluorescens* em leite reconstituído a 12% após 24 horas estão em torno de 10⁸ UFC/mL (média de 2,25x10⁸ a 23⁰C e 6,24x10⁸ a 30⁰C). No entanto, nas tabelas 5 e 6 podemos observar que o crescimento em leite reconstituído a 1% a população final foi inferior, atingindo média de 1,91x10⁷ a 23⁰C e 2,32x10⁷ a 30⁰C. Sendo assim, decidimos por utilizar leite reconstituído a 12% e temperatura de crescimento de 30⁰C para a formação dos biofilmes, uma vez que microrganismo apresentou as maiores médias finais de população nestas condições.

Uma vez determinadas às condições ótimas de cultivo do microrganismo, através dos resultados encontrados nos experimentos 1,2,3 e 4; experimentos foram realizados para avaliar o perfil da curva de crescimento do mesmo nestas condições. A figura 5 apresenta as curvas de crescimento realizadas para crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em leite reconstituído a 12% a 30⁰C durante 24 h.

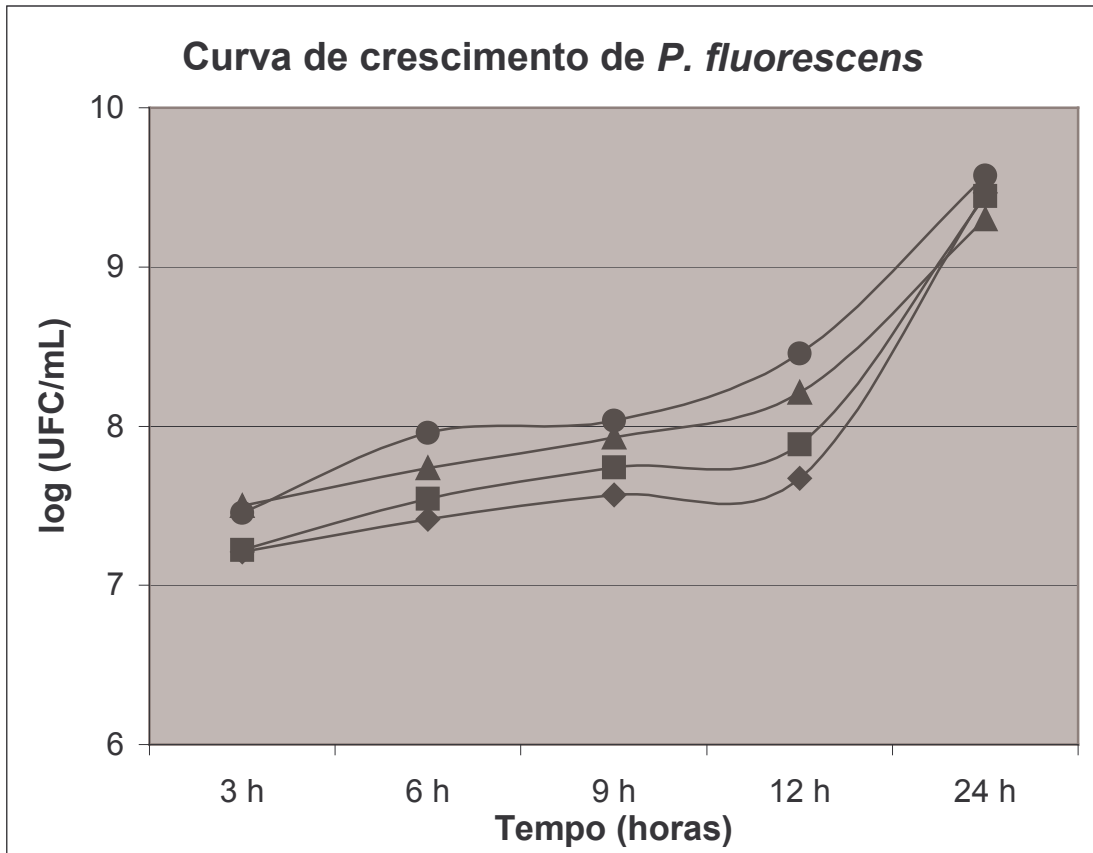


Figura 5: Curvas de crescimento da bactéria *Pseudomonas fluorescens* em leite reconstituído a 12% a 30⁰ C.: Experimento 1: ♦; Experimento 2: ■ ; Experimento 3: ▲; Experimento 4: ●

Através da figura 5 podemos observar que embora as concentrações iniciais não tenham sido iguais, as curvas apresentaram comportamento similar com suas fases Lag muito bem definidas e as fases exponenciais semelhantes com valores finais de concentrações entre 10^9 e 10^{10} UFC/mL.

7.2 Formação do biofilme

7.2.1 Modelo estático

A figura 6 apresenta os resultados de 4 ensaios para a formação de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* através do modelo estático. Nela estão apresentadas as contagens do microrganismo no meio de crescimento (leite a 12%), nas três águas de enxágüe e nas placas de aço inoxidável. Podemos observar que a cada enxágüe as células foram sendo desprendidas das placas para a água. Porém, a contagem final obtida através da metodologia de swab mostrou que o número de bactérias aderidas nas placas foi superior às aquelas obtidas no último enxágüe, o que nos indicou uma possível formação de biofilme.

As figuras 7 e 8 apresentam micrografias de colônias de *Pseudomonas fluorescens* em resíduo de leite sob placa de aço inoxidável (microscopia eletrônica de varredura). Pode-se notar nas referidas micrografias estruturas que indicam a formação de substâncias substância extracelular polimérica (SEP). Segundo o modelo de formação descrito por Marshall *et al.* (1971), na segunda etapa do mesmo, uma vez adsorvida a bactéria, o processo de formação é tempo-dependente. Esta etapa envolve a produção da substância extracelular polimérica (SEP) que funciona como âncora da bactéria na superfície. Esta etapa é irreversível, já que as bactérias encontraram-se em condições propícias para sua multiplicação, aderindo-se fortemente à superfície, multiplicando-se e formando inúmeras camadas que dificultam a remoção.

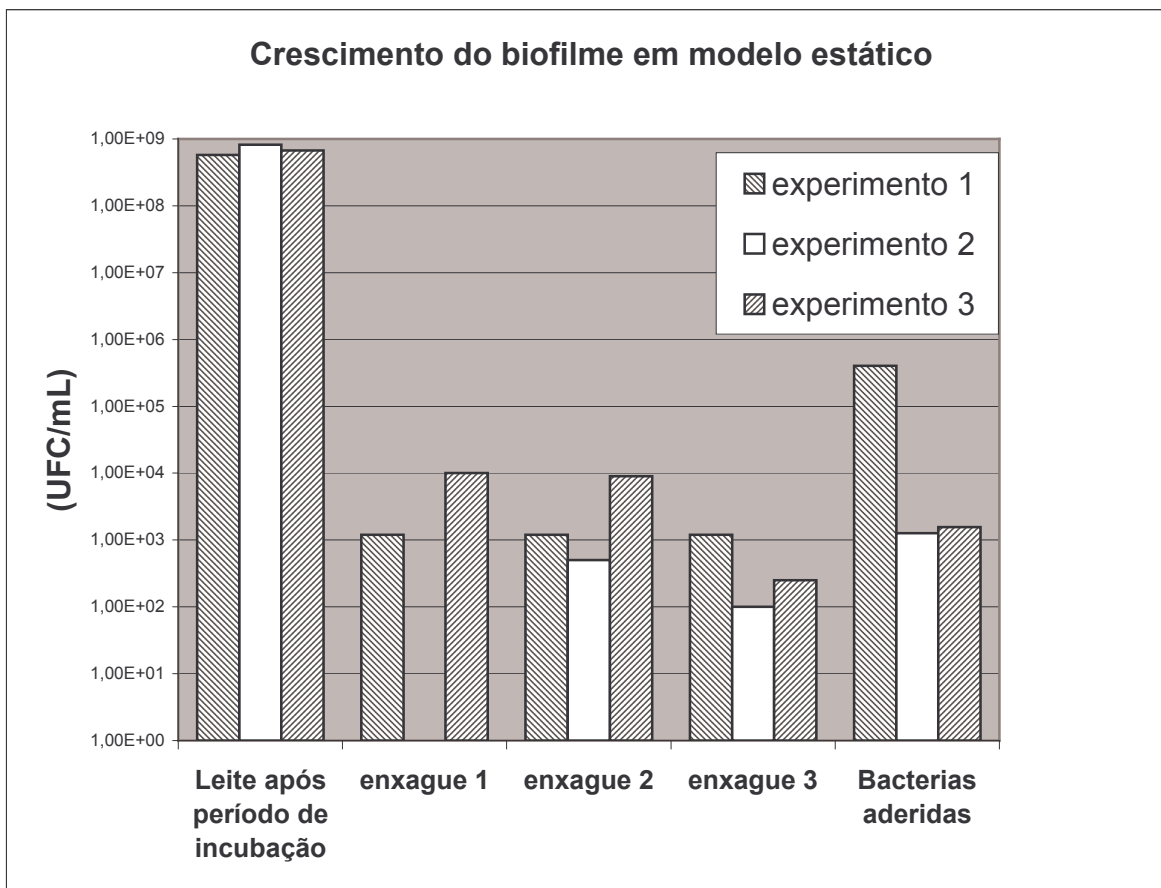


Figura 6: *Pseudomonas fluorescens* (UFC/mL) no meio de crescimento (leite a 12%), nas águas de enxágüe e nas placas de aço inoxidável pelo modelo estático.

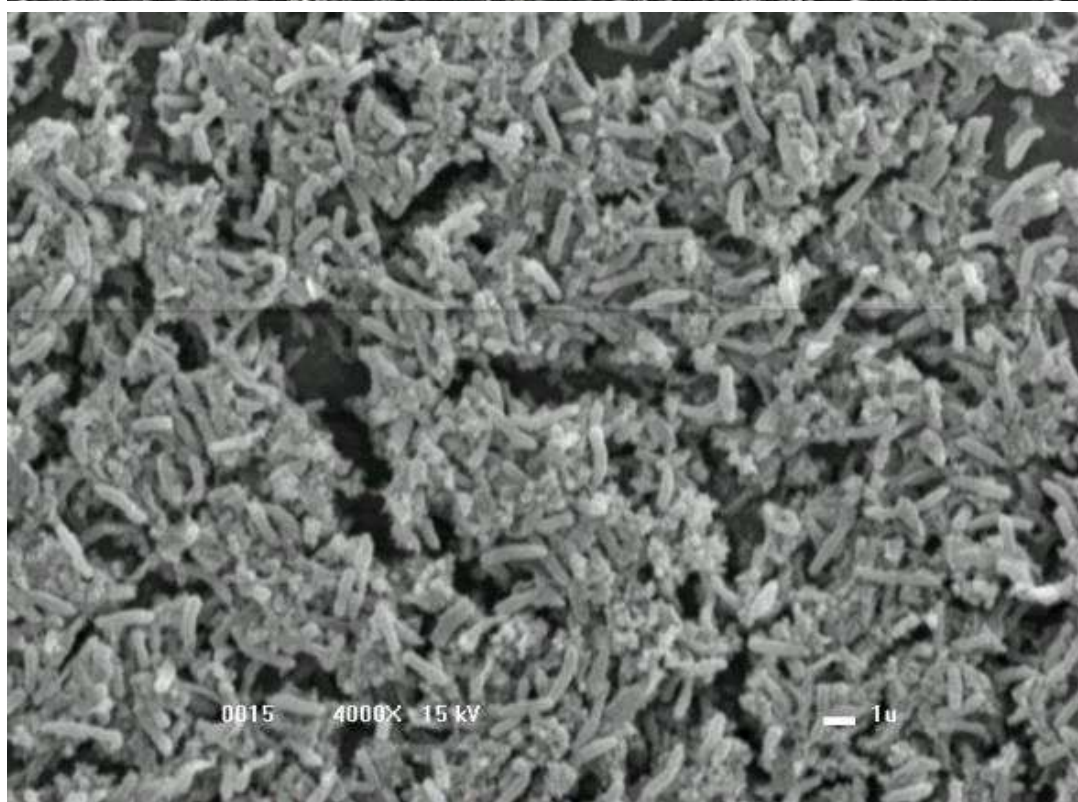
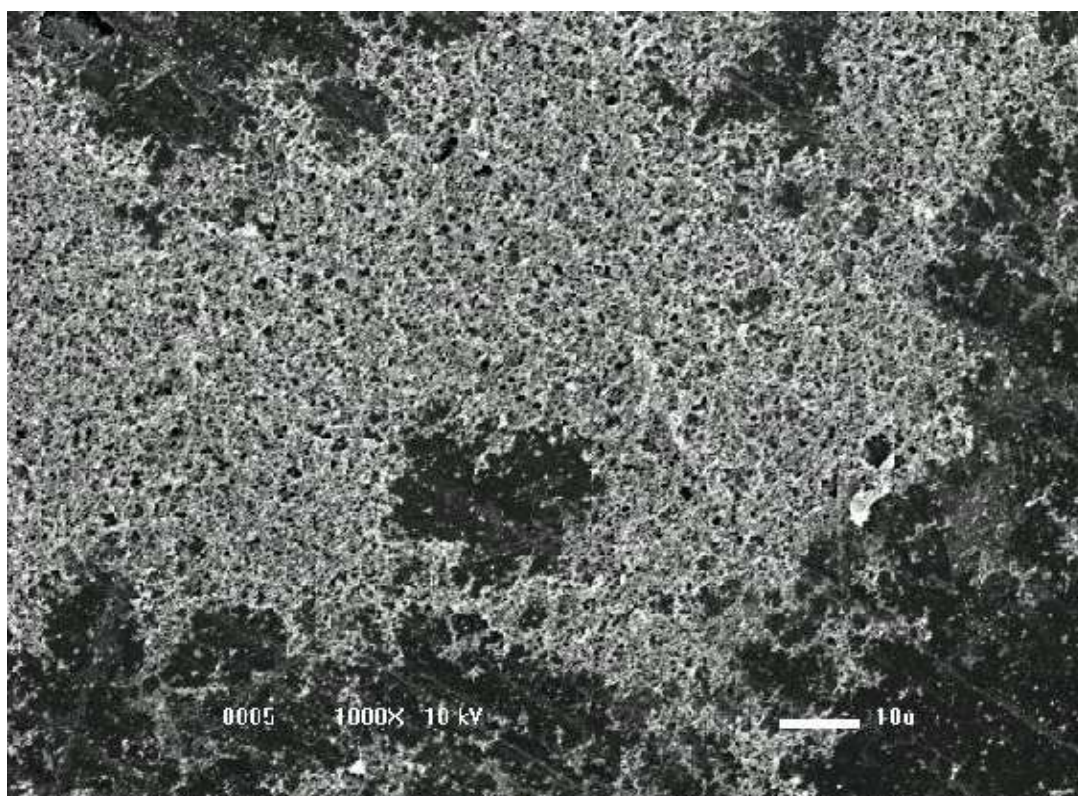


Figura 7: Micrografia de colônias de *Pseudomonas fluorescens* em resíduo de leite sob placa de aço inoxidável (microscopia eletrônica de varredura)

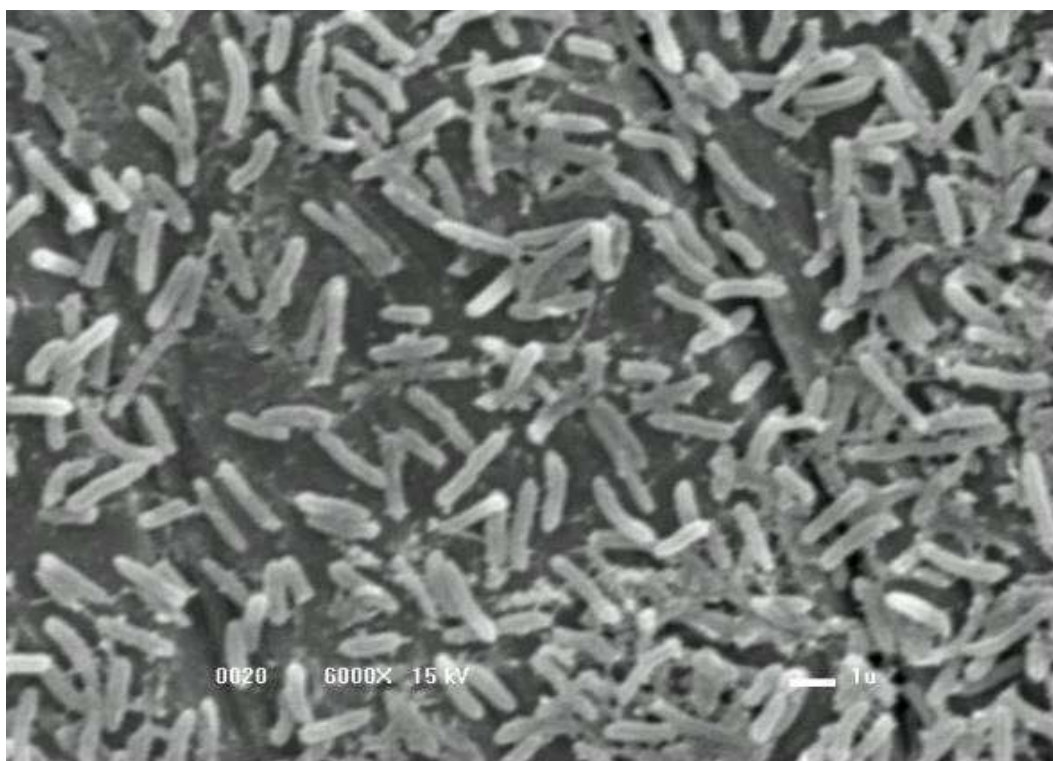
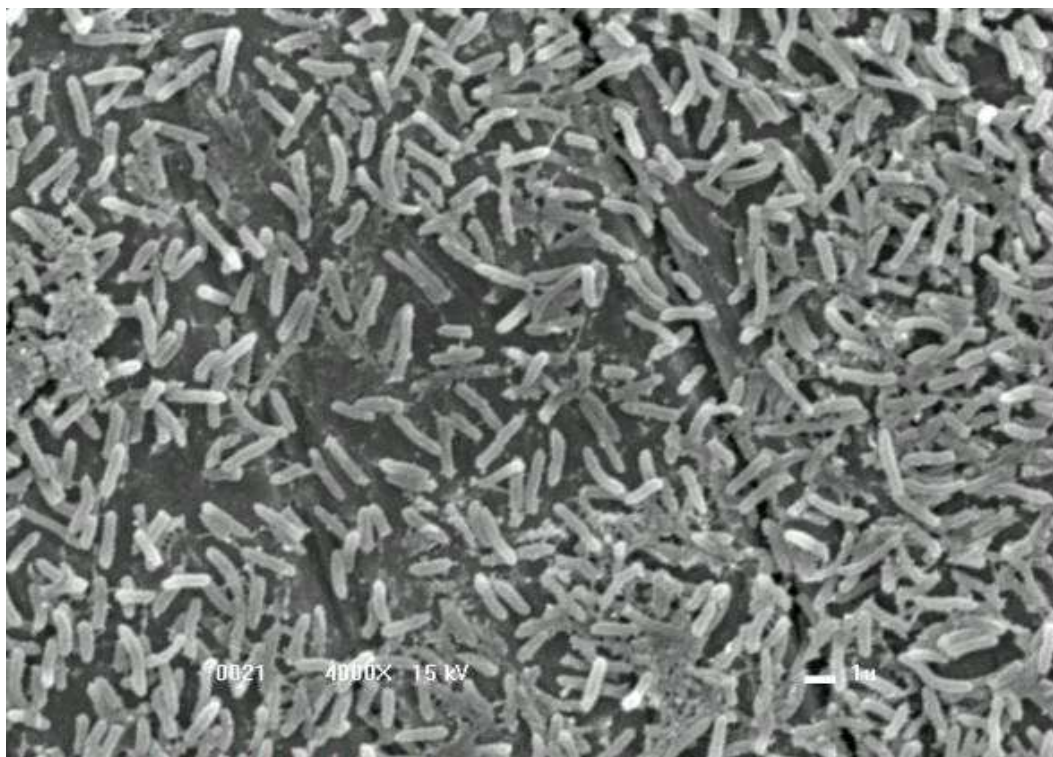


Figura 8: Colônias de *Pseudomonas fluorescens* aderidas à placa de aço inoxidável onde podem ser notadas estruturas que indicam formação de SEP (substâncias exopoliméricas).

Na figura 9 a qual apresenta as médias de todos os experimentos apresentados na figura 6, a afirmação feita anteriormente fica mais fácil de ser visualizada. É possível observar que mesmo após três lavagens em sistema com agitação, o número de células que permaneceram aderidas à placa é, em média, superior a 10^5 UFC por placa.

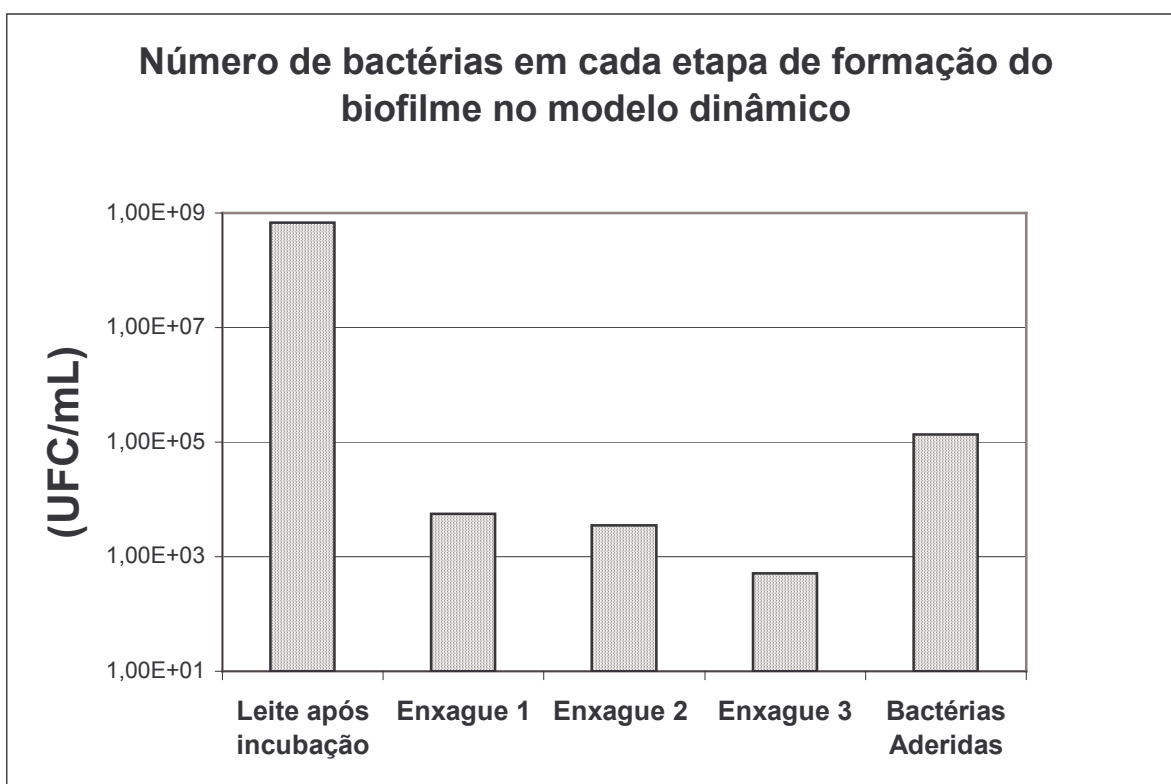


Figura 9: Médias dos experimentos realizados para formação do biofilme através do modelo dinâmico.

Existem inúmeras teorias sobre os parâmetros que influenciam a adesão das bactérias em superfícies, tais como: contato com nutrientes, sujidades acumuladas, topografia da superfície incluindo fendas ou rachaduras e o fluxo de passagem do meio em que estes se encontram. Assim existe uma grande variabilidade de fatores em um mesmo sistema levando a uma distribuição não uniforme do microrganismo nas superfícies (Stone & Zottola, 1985a).

7.2.2 Modelo dinâmico

Vários experimentos foram realizados seguindo o modelo experimental de Gândara (1995) utilizando *Pseudomonas fluorescens*, porém os resultados não foram satisfatórios, não sendo possível encontrar reprodutividade entre as placas do mesmo experimento e experimentos realizados em dias diferentes. Outro problema enfrentado foi o tempo de crescimento necessário para o microrganismo iniciar sua adesão às placas (acima de 72 horas), o que propiciou o crescimento e contaminação do leite por outras bactéria e fungos, ficando inviável a continuação deste modelo.

7.3 Esterilização a Plasma

7.3.1 Verificação da Uniformidade de Destruição Bacteriana pelo Plasma no Interior da Câmara

A uniformidade de distribuição do plasma dentro de um sistema fechado é importante uma vez que todos objetos presentes dentro da câmara deveriam receber um tratamento igual para que a destruição microbiológica de todo material sendo processado atinja um mínimo determinado. Este é um procedimento comum na validação de autoclaves que utilizam vapor de água ou água aquecida para esterilização de materiais cirúrgicos ou alimentos. Holler et al. (1993) realizaram experimentos alternando as posições dos carreadores dentro da câmara do esterilizador, utilizando diferentes bactérias e gás plasma de peróxido de hidrogênio, porém a posição não teve influência direta na efetividade do plasma.

Três experimentos colocando cinco placas em cada processo distribuídas conforme a figura 4. No protótipo de esterilizador utilizado, havia apenas uma bandeja para suporte de material, a qual localizava-se na região central da câmara (diametral). Os três experimentos foram conduzidos nas mesmas condições de

operação do equipamento (potência de 75 Watts, pré-plasma 4 minutos e tempo de exposição de plasma de 10 minutos).

A tabela 7 apresenta as médias de reduções decimais de *P. fluorescens* obtidas para cada posição das placas dentro da câmara de esterilização. Podemos observar que as posições 3 e 4 foram as que apresentaram as menores médias e a posição 1 a maior delas.

Tabela 7: Avaliação de destruição das bactérias pelo plasma em diferentes posições na câmara em função do numero de reduções decimais.

Posições	Processo			Média
	1	2	3	
1	3,0	1,5	1,4	2,0
2	2,6	1,6	1,3	1,8
3	1,8	1,5	1,7	1,7
4	1,4	1,4	1,7	1,5
5	2,7	0,8	1,8	1,8
Média	2,3	1,4	1,6	1,7
DP	0,65	0,32	0,22	0,17
CV	29%	23%	14%	10%

Um teste de Tukey para médias foi realizado e o resultado indicou não existir uma diferença significativa ($p < 5\%$) entre as mesmas. Isto nos leva a concluir que nas condições utilizadas não exista diferença entre as posições em termos de eficiência de inativação da bactéria. No entanto, podemos observar pela tabela 7 que os desvios padrões encontrados, e consequentemente os coeficientes de variação, foram bastante significativos ($CV > 29\%$). Com isto concluímos que existe uma deficiência em termos de distribuição da eficiência do

plasma dentro da câmara. Este fato pode estar relacionado a uma pobre distribuição do sanificante dentro da câmara, o qual foi injetado por uma válvula localizada em uma das extremidades da mesma. Cristianini (2002) mencionou que no desenvolvimento do segundo protótipo em desenvolvimento pela mesma empresa, o qual tem uma câmara de volume muito superior (800 a 1000L), foi utilizado um novo artifício para melhorar a distribuição do sanificante evitando este tipo de problema.

Segundo Moisan *et al.* (2001), a espessura da camada de bactérias presentes em uma superfície ou objeto influencia diretamente na capacidade do plasma penetrar na célula bacteriana e romper seu DNA. Isto implica em que materiais cobertos por microrganismos aumenta o tempo necessário para que a esterilização seja atingida.

Foram escolhidas as posições 3, 4 e 5 (figura 4) para dar sequência nos experimentos, uma vez que estas posições foram as que apresentaram menores médias, ou seja, estariam sujeitas às menores inativações do microrganismo.

7.3.2 Planejamento Fatorial 2^2

Um planejamento experimental fatorial 2^2 foi realizado com a finalidade de estudar o efeito das variáveis: tempo de exposição e potência do plasma no número de reduções logarítmicas do microrganismo. A tabela 8 apresenta os níveis utilizados para as variáveis independentes (+1 -1) e os resultados obtidos para o número de reduções decimais na população de *P. fluorescens*.

Tabela 8: Níveis utilizados para as variáveis independentes codificados (+1 –1) e número de reduções decimais (NRD) obtidos na população de *P. fluorescens*.

<i>Ensaio</i>	<i>Potência</i>	<i>Tempo de exposição ao plasma</i>	<i>NRD</i>
1	1	1	2,56
2	1	-1	1,66
3	-1	1	1,79
4	-1	-1	1,70
5 (C)	0	0	0.75
6 (C)	0	0	0.62
7 (C)	0	0	0.93

A tabela 9 apresenta os efeitos lineares para potência e tempo de exposição ao plasma, bem como a interação de duas vias. Em negrito os valores significativos a 5%.

Tabela 9: Análise dos efeitos lineares da potência e tempo de exposição ao plasma no número de reduções decimais (NRD) de *P. fluorescens*.

Efeitos Estimados: variável de resposta NRD $R^2=0,75$; Ajuste:0,51						
	Efeito	Erro puro	t(2)	p	Limite de confiança -95, %	Limite de confiança +95, %
Média/Interações	1,7991	0,0229	78,2561	0,0001	1,7002	1,8980
(1)Potência (L)	0,3683	0,0608	6,0561	0,0261	0,1066	0,6300
(2)Tempo exposição (L)	0,4933	0,0608	8,1100	0,0148	0,2315	0,7550
1L por 2L	0,4097	0,0608	6,7366	0,0213	0,1480	0,6714

Em negrito: valores significativos ($p<0,05$)

Podemos observar pela tabela 9 que os efeitos das variáveis independentes potência e tempo de exposição ao plasma, bem como a interação linear entre elas (1L por 2L) foram significativos ($p<0,05$). Ainda, podemos observar que o R^2 encontrado foi de 0,76. Este valor pode ser explicado, primeiro, por se tratar de estudos envolvendo contagens microbianas, ou seja, todos os erros experimentais e conceituais envolvidos em uma análise deste tipo. Segundo, por se tratar de um estudo exploratório e de um equipamento em fase de desenvolvimento, onde tanto o processo, quanto os equipamentos de controle e ajuste do sistema estão em exploração de uso.

Analisando-se os efeitos da tabela 9 podemos observar que na faixa de estudo utilizada para as variáveis independentes, tanto a potência quanto o tempo de exposição ao plasma tiveram efeitos positivos. O tempo de exposição teve um efeito maior na destruição do microrganismo, porém, vale ressaltar aqui que esta

última é uma variável temporal. Este fato também impede de considerar a interação encontrada entre potência e tempo de exposição ao plasma como sendo sinérgica.

7.3.3 Efeito do Tempo de Pré-plasma

Testes preliminares indicaram que havia um efeito de inativação da *P. fluorescens* pela ação do sanificante mesmo antes da descarga elétrica e formação do plasma. Alguns autores (Jacobs & Lin, 1987; Campbell e Moulton, 1995; Moisain *et al.*, 2001) apresentam ciclos de operação de equipamentos comerciais (Sterrad®) nos quais utilizam um chamado tempo de difusão do sanificante. Este tempo é aquele compreendido entre a injeção do sanificante na câmara e a descarga elétrica para a formação do plasma (podem chegar até 40-50 minutos), onde além de melhorar a difusão do gás no interior da câmara, o mesmo pode exercer um efeito sanificante.

Sendo assim, foi avaliado nesta etapa o efeito do tempo de difusão do Proxitane® 1512 dentro da câmara sob as células aderidas às placas. Três placas do bioindicador foram colocadas no interior da câmara (nas posições 3, 4 e 5, figura 4) e 0,8 mL do sanificante foi injetado após a obtenção do vácuo no interior da mesma. Foram avaliados os tempos de residência de 3, 5, 7 e 10 minutos.

A figura 11 apresenta uma curva com o número de reduções decimais obtidas em função do tempo de exposição ao gás de Proxitane® 1512.

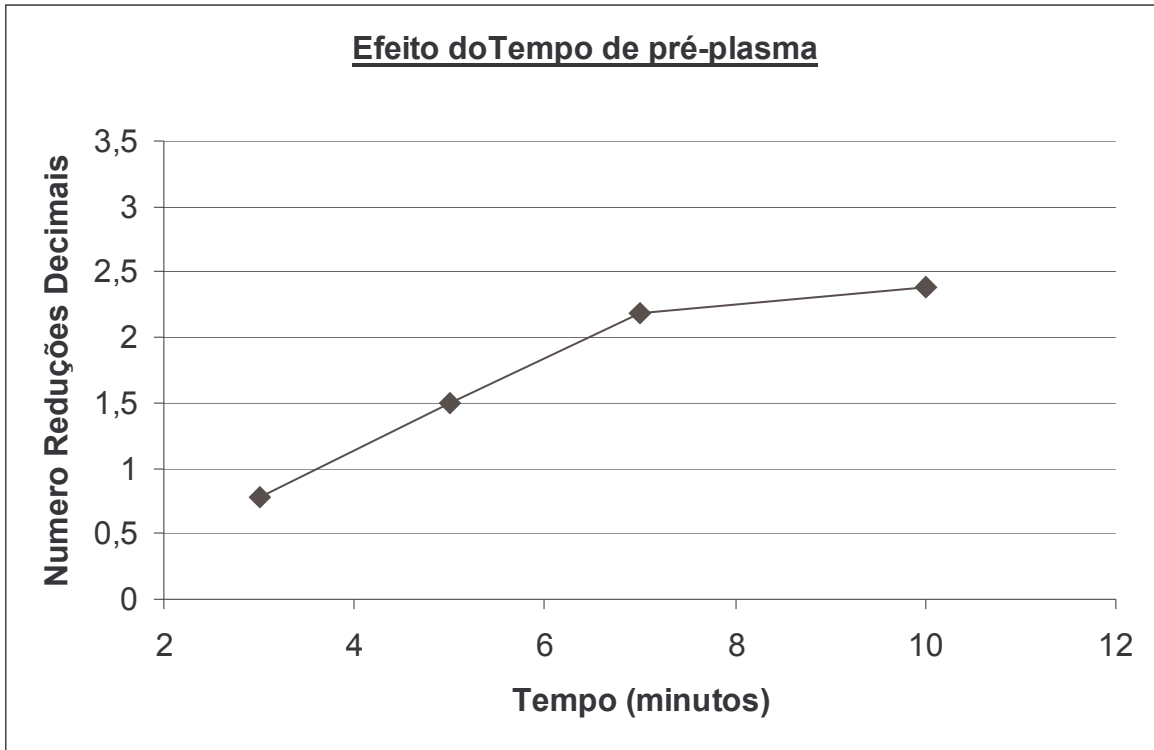


Figura 10: Avaliação do efeito do tempo do gás de Proxitane[®] na inativação de *P. fluorescens*.

Podemos observar na figura 10 que existe um efeito positivo na inativação de *P. fluorescens* em função do tempo de exposição ao pré-plasma do sanificante. Acima de 7 minutos foi possível obter reduções superiores a dois ciclos logarítmicos na inativação do microrganismo.

Segundo Moisan *et al.* (2001), o caráter higroscópico dos microrganismos favorece a condensação de vapores na superfície dos mesmos. Isto significa que o vapor de ácido peracético pode condensar-se nos aglomerados de microrganismos exercendo uma função bactericida. Este mecanismo é o princípio utilizado pelos esterilizadores a plasma comerciais quando aplicam um tempo de pré-plasma. Segundo o autor, dois sistemas disponíveis comercialmente, o Sterrad[®] (o qual utiliza peróxido de hidrogênio) e o Plaz-lyte[®] (o qual utiliza ácido peracético) utilizam este efeito para alcançar grande parte do efeito bactericida em seus processos, nos quais estes tempos de exposição podem chegar a 40-50 minutos.

7.3.4 Planejamento Fatorial 2^3

Uma vez que observado um efeito de inativação da *P. fluorescens* pelo tratamento de pré-plasma (item 7.5.7), decidimos por avaliar o efeito deste pré tratamento em sinergia com os efeitos da potência e tempo de exposição ao plasma encontrados no estudo realizado anteriormente (item 7.5.6). Sendo assim, um planejamento experimental fatorial 2^3 foi realizado com a finalidade de estudar o efeito das variáveis tempo de pré-plasma, tempo de exposição e potência do plasma no número de reduções logarítmicas do microrganismo. A faixa de potência utilizada neste estudo foi o mesmo do estudo realizado no item 7.5.6. uma vez que esta era uma limitação do protótipo em desenvolvimento, segundo informações do fabricante. As faixas de tempo de pré-plasma e de exposição ao plasma também foram reduzidas para que fosse possível observar os efeitos de reduções logarítmicas no microrganismo. Faixas maiores poderiam eliminar totalmente os mesmos uma vez que a contagem inicial dos bioindicadores era da ordem de 10^6 UFC.

A tabela 10 apresenta os níveis codificados (+1 -1) utilizados para as variáveis independentes e o número de reduções decimais obtidas na população de *P. fluorescens*.

Tabela 10: Análise dos efeitos da potência, tempo de exposição ao plasma e tempo de pré-plasma no número de reduções decimais (NRD) de *P. fluorescens*

<i>Variáveis independentes</i>				<i>Variável resposta</i>
Ensaio	Potência	Tempo de exposição	Tempo de pré-plasma	NRD
1	1	1	1	5,16
2	1	1	-1	4,36
3	1	-1	1	2,00
4	1	-1	-1	1,81
5	-1	1	1	2,20
6	-1	1	-1	1,71
7	-1	-1	1	1,91
8	-1	-1	-1	1,76
9 (C)	0	0	0	2,09
10 (C)	0	0	0	1,54
11 (C)	0	0	0	1,50

Tabela 11: Análise dos efeitos lineares da potência, tempo de exposição ao plasma e tempo de pré-plasma no número de reduções decimais (NRD) de *P. fluorescens*.

Efeitos estimados; Variável de resposta : NRD						
R²=0,90; Ajuste:0,75						
	Efeito	Efeito puro	T(2)	p	Limite de Confiança -95,%	Limite de confiança +95,%
Média/Interação	2,3657	0,0989	23,9306	0,0017	1,9403	2,7910
(1) Potência (L)	1,4404	0,2318	6,2132	0,0249	0,4429	2,4380
(2) Tempo de Exposição (L)	1,4859	0,2318	6,4091	0,0235	0,4884	2,4834
(3) Pré-plasma (L)	0,4070	0,2318	1,7557	0,2212	-0,5905	1,4046
1L por 2L	1,3646	0,2318	5,8859	0,0277	0,3671	2,3621
1L por 3L	0,0848	0,2318	0,3660	0,7495	-0,9127	1,0824
2L por 3L	0,2394	0,2318	1,0327	0,4103	-0,7581	1,2369

Em negrito: valores significativos (p<0,5)

Podemos observar pela tabela 11 que os efeitos das variáveis independentes potência e tempo de exposição ao plasma, bem como a interação linear entre elas (1L por 2L) foram significativos (p<0,5). Ainda, podemos observar que o R² encontrado foi de 0,90 explicando uma boa correlação entre os dados. A análise do modelo através de uma tabela ANOVA não foi realizada neste estudo. Esta análise não faz sentido neste momento devido às faixas de operação que

foram escolhidas. Por se tratar de um equipamento em fase de desenvolvimento nosso maior interesse foi estudar os efeitos das variáveis independentes dentro das faixas de estudo que nos permitia contagens de sobreviventes.

Analisando-se os efeitos das variáveis (tabela 11), podemos observar que todos foram positivos na faixa de estudo. O tempo de exposição apresentou o maior efeito sendo um pouco superior à potência do plasma, em concordância com os resultados apresentados no planejamento 2^2 (item 8.3.2). Isto sugere que para sistemas onde o aumento de potência seja um fator econômico forte a ser considerado, o tempo de processo pode ser aumentado, resultando, porém, em perda de produtividade.

O tempo de pré-plasma apresentou efeito significativo de $p < 0,22$. Embora a análise dos efeitos tenha sido feita para $p < 0, 5$, considerando que este é um estudo de desenvolvimento de equipamento e todos os erros envolvidos em análises microbiológicas, podemos considerar um intervalo de 78% de confiança aceitável para este efeito. Este efeito foi positivo, porém inferior as outras variáveis independentes dentro das faixas estudadas.

Foram obtidas placas onde não foi possível obter a recuperação das bactérias submetidas ao plasma (nos limites superiores das variáveis no planejamento), indicando que houve uma completa inativação do mesmo.

8 Conclusões

- O crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em leite reconstituído a 12% após 24 horas foi satisfatório, obtendo-se populações finais em torno de 10^8 UFC/mL (média de $2,25 \times 10^8$ UFC/mL a 23°C e $6,24 \times 10^8$ UFC/mL a 30°C).
- Através de um sistema modelo estático de crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em leite foi possível obter contagens acima de 10^5 UFC por placa de aço inoxidável, mesmo após três ciclos de lavagem das placas em água estéril sob agitação.
- Um teste de médias mostrou não haver diferença significativa ($p < 0,05$) de destruição do microrganismo pelo plasma dentro da câmara. Porém, existe uma deficiência na distribuição do mesmo, uma vez que os coeficientes de variação encontrados foram altos.
- Foi observado um efeito positivo na inativação de *P. fluorescens* em função do tempo de pré-plasma do sanificante. Exposições acima de 7 minutos foram capazes de produzir reduções superiores a dois ciclos logarítmicos na inativação do microrganismo.
- Um planejamento experimental fatorial 2^3 mostrou que as variáveis tempo de pré-plasma, tempo de exposição ao plasma, e potência apresentaram efeitos positivos na inativação de *Pseudomonas fluorescens*. O tempo de exposição apresentou o maior efeito, sendo porém, pouco superior à potência do plasma. Isto sugere que para sistemas onde o aumento de potência seja um fator econômico forte a ser considerado, o tempo de processo pode ser aumentado.

9 Referências Bibliográficas

- ADLER, S.; SCHERRER, M.; DASCHNER, F. D. Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other esterilization methods. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, p. 125-134, 1998.
- ALFA, J. M.; DE CAGNE, P.; OLSON, N. Bacterial killing ability of 10% ethylene oxide plus 90% hydrochlorofluorocarbon sterilizing gas. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n.9, p. 641-645, 1997.
- ALMEIDA, I. C.; SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P. Pesquisa de atividade lipolítica e/ ou proteolítica em cepas psicotróficas de *Pseudomonas* spp. E *Bacillus* spp. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 71, p. 58-60, 2000.
- ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na Indústria de Alimento**. 1^o ed. São Paulo: Varela, 1996. 182p.
- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.
- AUSTIN, J. W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, Grã Bretanha, v. 62, n. 3, p. 509-519, 1995.
- BATHINA, M. N; MICKELSEN, S.; BROOKS, C.; JAMARILO, J.; HEPTON, T.; KUSUMOTO, F. M. Safety and efficacy of hydrogen peroxide plasma sterilization for repeated use of electrophysiology catheteres. **Journal American College of Cardiology**, v.32, n. 5, p. 1384-1388, 1988.

- BIALASIEWICZ, A. A.; FÖRTSCH, M.; SAMMANN, A.; DRAEGER, J. Plasma sterilization of selected ophthalmic instruments for combined intraocular surgery. **Ophthalmic Res.**, v. 27, suppl 1, p. 124-127, 1995.
- BOUREON, F.; CERF O. Disinfection efficacy against pure culture and mixed population biofilms of *Listeria ennocua* and *Pseudomonas auruginosa* on stainlest steel, teflon (R) and rubber. **Science des Aliments**, v.16, p. 151-156, 1996.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistic for Experimenters**. Na Introduction to Designe, Data Analysis, and Model Building. Nova York: John Wiley & Sons, 1978. 653 p.
- BRYCE, E. A.; CHIA, E.; LOGELIN, G.; SMITH, J. A. Na evaluation of the Ab Tox Plazlyte sterilization system. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, September, p. 646-653, 1997.
- BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H. Specific and non- specific interections in bacterial adhesion to soiled substrata. **FEMS Microbiology**, review, v. 46, p. 165-173, 1987.
- CHAPMAN, B. N. **Glow Discharge Process**, Nova York: John Wiley & Sons, 1980, chapter 3.
- CHARACKLIS, W. G.; COOKSEY, K. C. Biofilms and microbial fouling. **Adv. Applied Microbiology**, v. 29, p. 93-137, 1983.
- CHAU, T.; CHIKAO, K.; BLANK, G.; MADRID, F. Microwave plasmas for low temperature dry sterilization. **Biomaterials**, v. 17, n° 13, p. 1273-1277, 1996.

CRISTIANINI, M. **Sistema de distribuição do sanificante na câmara do plasma** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <marceladuran@hotmail.com> em 21 de outubro de 2002.

CRIADO, M. T.; SUARÉZ, B.; FERREIRÓS, C. M. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. **Food Technology**, February, p. 132-126, 1994.

CROW, S.; SMITH III, J. H. Gás plasma sterilization application of space age technology. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 16, n. 8, p. 483-487, 1995.

DAVIS, B. D.; DULBICCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. **Microbiology including human and molecular genetics**. 3^o ed. Londres: Harper and Row, 1980, 1355p.

DUNSMORE, D. G.; TWOMEY, A.; WHITTLESTONE, W. G.; MORGAN, H. W. Design and performance of systems for cleaning product – contact surfaces of food equipment: a review. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 44, n. 3, p. 220-240, 1981.

ELORTONDO, P. F. J.; SALMERÓN, J.; ALBISU, M.; CASAS, C. Formación de películas biológicas en la industria alimentaria. Biofilms in food industry. **Food Science Technology International**, USA, v. 5, n. 1, p. 25-30, 1999.

FATEMI, P.; FRANK, J. Inactivation of *Listeria monocytogenes* / *Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. **Journal of Food Protection**, v. 62, n.7, p. 761-765, 1999.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1^o ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FRANK J. F.; CHMIELEWSKI R. Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food preparation surfaces. **Journal of Food Protection**, v.60, p. 43-47, 1997

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 3^o ed. Zaragoza, Espanha: Acribia S.A., s.d. 522p.

GÂNDARA, A. L. N. **Características de crescimento de uma linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus*, sua adesão em superfície do aço inoxidável e comportamento frente à detergência e sanificação**. Campinas, 1995. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

GOGOLEWSKI, S.; MAINIL-VARLET, P.; DILLON, J. G. Sterility, mechanical properties, and molecular stability of polylactide internal-fixation devices treated with low-temperature plasmas. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 32, p. 227-235, 1996.

GOLDMAM, M.; PRUITT, L. Comparison of effects of gama radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behavior of UHMWPE. **Journal of Biomedical Materials Research**, p. 378-384, 1998.

TAVARES, D. Q; **Manual Técnico Científico**, Laboratório de Microestrutura de Alimentos, documento nº PA 11.1. DEPAN/FEA UNICAMP, 2003.

HÖLLER, C.; MARTYNI, H.; CHRISTIANSEN, B.; RUDEN, H.; GUNDERMANN, O. K. The efficacy of low temperature plasma (LTP) sterilization, a new sterilization technique. **Zentralb Hgy Umweltmed**, v. 94, p. 380-391, 1993.

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

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganism during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v. 37, n. 2,3, p. 145-153, 1997.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. 3⁰ ed.. Zaragoza, Espanha: Acribia S.A., 1994. 804p.

KIRTLEY, S. A.; MC GUIRE, J. On differences in surface constitution of dairy product contact material. **Journal Dairy Science**, Baltimore, v. 72, n. 7, p. 1748-1753, 1989.

KREBS, M.C.; BÉCASSE, P.; VERJAT, D.; DARBORD, J. C. Gás-plasma sterilization: relative efficacy of the hidrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 160, p. 75-81, 1998.

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

LAWRENCE, J. R.; DELAQUIS, P. J.; KORBER, D. R.; CALDWELL, D. E. Behaviour of *Pseudomonas fluorescens* within the hidrodynamic boundary layers of surface microenviromnemts. **Microbiology Ecology**, v. 14, p. 1-14, 1987.

LINDSAY, D.; HOLEY, A. V. Different responses of planktonic and attached *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* to sanitizer treatmente. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 62, n 4, p. 368-379, 1999.

MACÊDO, J. A. B.; ANDRADE, N. J.; SILVA, C. A. B.; MACEDO, C. S. ACQUASIST-Sistema Especialista para controle e tratamento de água- II. Indústria de Alimentos. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS,1., 1996, Belo horizonte. **Resumo 14.** Programa Belo horizonte,1996.

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

MATTILA, T.; MANNINEM, M.; KYLÄSIUROLA, A. L. Effect of cleaning in place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. **Journal of Dairy Research**, Grã Bretanha, v. 57, p. 33-39, 1990.

MICRORGANISMOS Patogênicos nos Alimentos. São Paulo: Lever Industrial. (“s.d”)

MITTELMAN, M. W. Symposium: Biofilms: Development and control. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal Dairy Science**, Baltimore v. 81, n. 10, p. 2760-2764, 1998.

MOISAN, M.; BARBEAU, J.; MOREAU, S.; PELLETIER, J.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L. H. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 1-21, 2001.

NIGAN, P.; MARCHANT, R. Selection of a substratum for composing biofilm system of a textile- effluent decolourising bacteria. **Biotechnology Letters**, London, v. 17, p. 993-996, 1995.

NIGAN,P; MARCHANT,R.; MC MULLAN, G.; BANAT, I. M. Decolourisation of effluent from the textile industry by a microbial consortium. **Biotechnology Letters**, v. 18, p.117-120, 1996.

NOTERMANS, S.; DOORMANS, J. A. M. A.; MEAD, C. G. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: a review. **Biofouling**, v. 5, p. 1-16, 1990.

PASSOS, M. H. C. R. Limpeza de depósitos incrustantes de pasteurizador de leite por detergentes alcalinos e ácidos. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 105-112, 1994.

PICOT, L.; ABDELMOULA, S. M.; MERIEAU, A.; LEROUX, P.; CAZIN, L.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M. G. J. *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. **Microbs and Infection**, v.3, p. 985-995, 2001.

PETRUS, R. R. **Desenvolvimento de processo e avaliação de estabilidade de bebida isotônica acondicionada em garrafa plástica asséptica**. Campinas, 2000. Tese (mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PONTEFRAC, R.D. Bacterial Adherence: its consequences in food processing. **Canadian Institute Food Science Technology Journal**, Canadá, v. 24, n. 3/4 1991.

PUREVDORJ, D.; IGURA, N.; HAYAKAWA, I.; ARIYADA, O. Inactivation of *Escherichia coli* by microwave induced low temperature argon plasma treatments. **Journal of Food Engineering**, v. 53, p. 341-346, 2002.

RATNER, B. D.; CHILKOTI, A.; LOPEZ, G. P. **Plasma deposition, treatment, and etching of polymers**. Academic Press, Boston, MA, 1990.

RUTALA, W. A.; GERGEN, M. F.; WEBER, D. J. Comparative evaluation of sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: ethylene oxide, 2 plasma sterilization systems and liquid peracetic acid. **American Journal Infect Control**, August, p. 393-398, 1998.

SARNAIK, S.; KANEKAR, P. Biorremediation of colour of methylviolet and phenol from dye- industry waste effluent using *Pseudomonas* spp. Isolated from factory soil. **Journal Applied Bacteriology**, Grã Bretanha, v. 79, p. 459-469, 1995.

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

SCHNEIDER, P. M. Low-temperature sterilization alternatives in the 1900s. **Tappi Journal**, v. 77, n. 1, p.115-119, 1993.

SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9⁰ ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. 1599 p.

SOUTHWOOD, L. L.; BAXTER, G. M. Instrument sterilization, skin preparation, and wound management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 2, p. 173-194, 1996.

STOFFELS, E.; VENDER, D.; KANDO M.; KROESEN, G. M. W.; HOOG, F. J. .J. , Negative ions in a radio frequency oxygen plasma. **Physical Review**, E 51, 3, p. 2425-2435, 1995.

- STONE, L.S.; ZOTTOLA, E. A. Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 951-956, 1985a.
- STONE, L. S.; ZOTTOLA, E. A. Relationship between growth phase of *Pseudomonas fragi* and its attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, v.50, p.957-960, 1985b.
- STONE, L. S.; ZOTTOLA, E. A. Scanning electron microscopy study of stainless-steel finishes used in food processing equipment. **Food Technology**, Chicago, v. 39, n. 5, p. 110-114, 1985c.
- SWARTILING, P. The influence of the use of detergents and sanitizers on the farm with regard to the quality of milk and milk products. **Dairy Science Abstracted**, v. 21, p. 1-10, 1959.
- TAVARES, D. Q. **Manual Técnico Científico**. Laboratório de Microestrutura de Alimentos, DEPAN, FEA, UNICAMP. Documento nº PA 11.1,2003.
- UNIÃO INTERNACIONAL DAS SOCIEDADES DE MICROBIOLOGIA (IAMS). **APCC Na Qualidade e Segurança Microbiológica para Especificações Microbiológica dos Alimentos**. 1^o ed. São Paulo: Varela, 1997. 377p.
- VASSAL, S.; FAVENNEC, L.; BALLEST, J. J.; BRASSEUR, P. Hydrogen peroxide gas plasma sterilization is effective against *Cryptosporidium parvum* oocysts. **AJIC**, v. 26, n. 2, p. 136-138, 1998.
- WIRTANEN, G.; MATTILA-SANDHOLM. T. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne biofilm bacteria grown on stainless steel surfaces. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 56, n. 8, p. 678-683, 1993.

WIRTANEM, G.; HUSMARK, U.; SANDHOLM, T. M. Microbiol evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food- processing systems. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

WOONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal Dairy Science**, Baltimore, v. 81, n. 10, p. 2765-2770, 1998.

ZOBELL, C. E. The effect of soiled surfaces upon bacterial activity. **Journal Bacteriology**, v.46, p. 39-56, 1943.

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