

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS EM
MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE POLIAMIDA E
POLIETERSULFONA E SEU CONTROLE POR AGENTES
SANITIZANTES**

Liliane Rodrigues de Camargo

Engenheira Química

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Orientador

Prof. Dr Luiz Antonio Viotto

Co-orientador

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas obtenção do título de Mestre em Tecnologia de
Alimentos**

Campinas – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA - CRB8/5816 – BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - UNICAMP

C14f

Camargo, Liliane Rodrigues de, 1981-
Formação de biofilmes microbianos em membranas
poliméricas de poliamida e polietersulfona e seu controle
por agentes sanitizantes / Liliane Rodrigues de Camargo. –
Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye.
Co-orientador: Luiz Antonio Viotto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biofilmes. 2. *Escherichia coli*. 3. *Pseudomonas
aeruginosa*. 4. Filtros de membrana. 5. Sanitizantes.
I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Viotto, Luiz Antonio.
III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Título em inglês: Microbial biofilm formation in polymeric membranes of
polyamide and polyethersulfone and it's control by sanitizers agents

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Biofilms

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa

Membrane filters

Sanitizers

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Arnaldo Yoshiteru Kuaye [Orientador]

Karen Signori Pereira

Luciana Maria Ramires Esper

Data da defesa: 18/11/2011

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

LILIANE RODRIGUES DE CAMARGO

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS
DE POLIAMIDA E POLIETERSULFONA E SEU CONTROLE POR AGENTES
SANITIZANTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS.

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

ORIENTADOR

Prof. Dr. Luiz Antonio Viotto

CO-ORIENTADOR

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Liliane Rodrigues de Camargo, aprovada pela comissão julgadora em __/__/__ e orientada pelo Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye.

Assinatura do orientador

Campinas – SP

2011

LILIANE RODRIGUES DE CAMARGO

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS
DE POLIAMIDA E POLIETERSULFONA E SEU CONTROLE POR AGENTES
SANITIZANTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)

Prof. Dra Karen Signori Pereira
(Membro Titular)

Prof. Dra Luciana Maria Ramires Esper
(Membro Titular)

Prof. Dra Celina Mara Soares
(Membro Suplente)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro Suplente)

"Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter. O Espírito encarnado sofre constantes transformações por fora, a fim de acrisolar-se e engrandecer-se por dentro."

Chico Xavier

Dedico A Jesus Cristo,
a minha mãe Irma,
aos meus irmãos Dani e Emerson,
ao meu marido Júnior,
aos meus queridos sobrinhos Bia e Bruno.

Agradecimentos

À Deus e Jesus Cristo por me dar forças para superar todos os obstáculos.

À minha mãe por me ajudar nos momentos mais difíceis que tive em 2011.

À minha irmã por ser minha fiel amiga.

Ao meu marido Júnior por ter paciência e entender minhas ausências.

Aos meus sobrinhos por me darem tantas alegrias, me ajudando a superar todas as dificuldades que tive.

Ao Professor Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação dada para a execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Luiz Antonio Viotto pela co-orientação dada.

Ao Instituto de Biologia da Unicamp, especialmente à Adriane do laboratório de microscopia eletrônica, pelas dicas e ensinamentos.

A 3M, pelo tempo concedido para minha preparação e meu aprendizado, especialmente à Cláudia Kashiwakura, pelo grande apoio dado para o desenvolvimento deste trabalho.

A Alice Ribeiro pelo primeiro incentivo para iniciar este trabalho com a Unicamp.

Enfim, a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho com dicas, sugestões, paciência e companheirismo.

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Qualidade microbiológica da água mineral	3
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.2 Tratamentos empregados no processo de água mineral	6
2.3 Microfiltração de água	7
2.3.1 Histórico	7
2.3.2 Membranas filtrantes	7
2.4 Formação de biofilme microbiano	11
2.5 Métodos de avaliação de biofilmes	13
2.6 Métodos de controle de microrganismos	14
2.6.1 Controle de microrganismos pelo calor	15
2.6.1.1 Efeito do calor em células microbianas	15
2.6.2 Controle de microrganismos por sanitizantes químicos	16
2.6.2.1 Ácido Peracético	17
3 OBJETIVOS	20
4 MATERIAIS E METODOS	21
4.1 Materiais	21
4.1.1 Membranas Filtrantes utilizadas	21
4.1.2 Agentes sanitizantes	21
4.1.3 Microrganismos	22
4.2 Métodos	22
4.2.1 Compatibilidade das membranas com a solução de ácido peracético a 2%	22
4.2.1.1 Determinação do volume de água para enxágüe das membranas	22
4.2.1.2 Compatibilidade das membranas	23

4.2.1.3 Teste de integridade ponto de bolha	23
4.3 Avaliação da adesão e formação de biofilmes em membranas	24
4.3.1 Obtenção do inóculo	24
4.3.2 Técnica de coloração de gram	26
4.3.3 Contato das células bacterianas com as membranas	27
4.3.4 Quantificação das células do biofilme formado nas membranas	28
4.3.5 Análise estatística da adesão	29
4.3.6 Teste para verificação do entupimento das membranas	29
4.3.7 Avaliação visual da adesão à formação de biofilme por MEV	29
4.4 Avaliação da eficiência de sanitizantes	30
5 RESULTADOS	32
5.1 Avaliação da compatibilidade das membranas com solução de ácido peracético à 0,2%	30
5.2 Estudo da formação de biofilme microbiano em membranas de filtração de água mineral	33
5.2.1 Obtenção do inóculo	33
5.2.2 Desenvolvimento da população microbiana ao longo da formação dos biofilmes	33
5.2.2.1 – <i>Escherichia coli</i>	33
5.2.2.1.1 Análise de variância dos resultados	35
5.2.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
5.2.2.2.1 Análise de variância dos resultados	39
5.4 Teste para verificar o entupimento das membranas	40
5.5 Avaliação visual da formação de biofilmes por microscopia eletrônica de varredura	41
5.5.1 Análise da formação de biofilmes por <i>Escherichia coli</i>	42
5.5.2 Análise da formação de biofilmes por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
5.6 Avaliação da eficiência dos sanitizantes	49
5.6.1 Sanitização das membranas filtrantes após contato com suspensão de <i>E. coli</i>	49
5.6.2 Sanitização das membranas filtrantes após contato com suspensão de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54

6 DISCUSSÕES GERAIS	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APENDICE A Análise de variância dos resultados de aderência com <i>E.coli</i>	74
APENDICE B Análise de variância dos resultados de aderência com <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Escherichia coli</i> .	5
Figura 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio Agar.	6
Figura 3	Morfologia de membranas sintéticas.	8
Figura 4	Diagrama básico do transporte de massa em uma membrana.	9
Figura 5	Gráfico que caracteriza o aumento de vazão do fluxo de ar em relação ao teste de integridade.	11
Figura 6	Processos envolvidos na formação de biofilmes.	12
Figura 7	Esquema de montagem dos equipamentos para o teste de integridade.	24
Figura 8	Etapas para a obtenção da cultura de <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	25
Figura 9	Fluxograma das etapas realizadas para a formação do biofilme	28
Figura 10	Representação comparativa da população (log UFC/mL) de <i>E. coli</i> em suspensões de água mineral incubadas a 24, 48 e 72 horas e temperaturas de 5º, 25º e 35ºC.	35
Figura 11	Gráfico Boxplot da contagem (log UFC/cm ²) de <i>Escherichia coli</i> aderidos às membranas de poliamida nas temperaturas de 5ºC, 25ºC e 35ºC.	36
Figura 12	Gráfico Boxplot da contagem (log UFC/cm ²) de <i>Escherichia coli</i> aderidos às membranas de polietersulfona nas temperaturas de 5ºC, 25ºC e 35ºC.	36
Figura 13	Representação comparativa da população (log UFC/mL) de <i>P.aeruginosa</i> em suspensões de água mineral incubadas a 24, 48 e 72 horas e temperaturas de 5º, 25º e 35ºC.	38
Figura 14	Gráfico Boxplot da contagem (logUFC/cm ²) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aderidos às membranas de poliamida nas temperaturas de 5ºC, 25ºC e 35ºC.	39
Figura 15	Gráfico Boxplot da contagem (logUFC/cm ²) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aderidos às membranas de polietersulfona nas temperaturas de 5ºC, 25ºC e 35ºC.	40
Figura 16	Membrana de polietersulfona (branco) com aumento de 3000x.	42
Figura 17	Membrana de poliamida (branco) com aumento de 3000x.	43

Figura 18	Membrana de polietersulfona <i>com Escherichia coli</i> (após 24h) com aumento de 3000x.	44
Figura 19	Membrana de poliamida <i>com Escherichia coli</i> (após 24h) com aumento de 3000x.	44
Figura 20	Membrana de polietersulfona <i>com Escherichia coli</i> (após 72h) com aumento de 3000x.	45
Figura 21	Membrana de poliamida <i>com Escherichia coli</i> (após 72h) com aumento de 3000x.	46
Figura 22	Membrana de polietersulfona <i>com Pseudomonas aeruginosa</i> (após 24h) com aumento de 3000x	47
Figura 23	Membrana de poliamida <i>com Pseudomonas aeruginosa</i> (após 24h) com aumento de 3000x.	47
Figura 24	Membrana de polietersulfona <i>com Pseudomonas aeruginosa</i> (após 72h) com aumento de 3000x.	48
Figura 25	Membrana de poliamida <i>com Pseudomonas aeruginosa</i> (após 72h) com aumento de 3000x.	48
Figura 26	Número de cupons x número de redução de ciclos log/cm ² da bactéria <i>Escherichia coli</i> em membranas de poliamida após ação dos sanitizantes.	54
Figura 27	Número de cupons x número de redução de ciclos log/cm ² da bactéria <i>Escherichia coli</i> em membranas de polietersulfona após ação dos sanitizantes.	54
Figura 28	Número de cupons x número de redução de ciclos log/cm ² da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em membranas de poliamida após ação dos sanitizantes.	59
Figura 29	Número de cupons x número de redução de ciclos log/cm ² da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em membranas de polietersulfona após ação dos sanitizantes.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tempo de redução decimal (D) para calor de vários microrganismos.	15
Tabela 2	Especificação das membranas.	21
Tabela 3	Composição química da água mineral utilizada nos testes em mg/L.	24
Tabela 4	Delineamento experimental para avaliação da formação de biofilmes por <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> em membranas poliméricas.	28
Tabela 5	Valores de vazão de água em mL/min nas membranas para perda de carga inicial de 2 psi.	29
Tabela 6	Volume de água para enxágüe das membranas.	32
Tabela 7	Teste de integridade nas membranas após contato com solução sanitizante.	33
Tabela 8	População de <i>E. coli</i> (UFC/cm ²) aderidas aos cupons de membranas filtrantes.	34
Tabela 9	População de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC/cm ²) aderidas aos cupons de membranas filtrantes.	37
Tabela 10	Diferencial de pressão das membranas após contato com suspensão ^a de <i>E. coli</i> durante 24h e 72h de contato à 35°C.	40
Tabela 11	Diferencial de pressão das membranas após contato com suspensão ^a de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> durante 24h e 72h de contato à 35°C.	41
Tabela 12	Contagem de <i>Escherichia coli</i> nos cupons (branco / controle) antes da ação da solução sanitizante 0,1% e 0,2% e água à 85°C.	49
Tabela 13	Redução da contagem (Log UFC/cm ²) de <i>Escherichia coli</i> em nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução de ácido peracético na concentração de 0,1% durante 10 minutos.	50
Tabela 14	Redução de <i>Escherichia coli</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,1% durante 20 minutos.	50

Tabela 15	Redução de <i>Escherichia coli</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,2% durante 10 minutos.	51
Tabela 16	Redução de <i>Escherichia coli</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,2% durante 20 minutos.	52
Tabela 17	Redução de <i>Escherichia coli</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com água na temperatura de 85°C durante 10 minutos.	52
Tabela 18	Redução de <i>Escherichia coli</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com água na temperatura de 85°C durante 20 minutos.	53
Tabela 19	Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nos cupons (branco) antes da ação do ácido peracético 0,1% e 0,2% e água à 85°C.	55
Tabela 20	Redução de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,1% durante 10 minutos.	55
Tabela 21	Redução de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,1% durante 20 minutos.	56
Tabela 22	Redução de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante ácido peracético na concentração de 0,2% durante 10 minutos.	57
Tabela 23	Redução de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,2% durante 20 minutos	57
Tabela 24	Redução de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato	

	com água na temperatura de 85°C durante 10 minutos.	58
Tabela 25	Redução de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Log UFC/cm ² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com água na temperatura de 85°C durante 10 minutos.	58
Tabela A1	Análise ANOVA para <i>Escherichia coli</i> em membranas de poliamida.	74
Tabela A2	Análise ANOVA para <i>Escherichia coli</i> em membranas de polietersulfona.	74
Tabela B1	Análise ANOVA para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em membranas de poliamida.	75
Tabela B2	Análise ANOVA para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em membranas de polietersulfona.	75

RESUMO

O grande consumo de águas minerais tem alavancado muitos estudos de relação caracterização microbiológica, nas mais diversas regiões brasileiras. Trabalhos revelam que a grande maioria das águas brasileiras envasadas e águas de poços artesianos possuem contaminação microbiana, causando grande preocupação com relação à qualidade da água a ser consumida. Dentre os processos para tratamento da água mineral, a fim de atender as exigências comerciais e de legislações, está a microfiltração. O processo consiste da utilização de filtros de membranas poliméricas, nos quais os microrganismos ficam retidos (barreira mecânica). De acordo com a Resolução RDC nº 275/2005 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os microrganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, estão inseridos, juntamente com outras bactérias, como *Enterococos*, *Clostridium perfringens* e coliformes totais no quadro de controle microbiano de águas minerais. Devido à utilização dos filtros de membrana para controle destes microrganismos, há a necessidade da realização da sanitização desses filtros para evitar proliferação de microrganismos na superfície; prevenindo o entupimento dos poros da membrana e contaminação do processo. O sanitizante a base de ácido peracético e água quente são os principais agentes sanitizantes utilizados na indústria de água mineral para sanitização de equipamentos. Assim este trabalho objetivou avaliar a formação de biofilme microbiano de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em membranas poliméricas de poliamida e polietersulfona e a eficiência da sanitização das membranas por solução de ácido peracético a 0,1%, 0,2% e água quente a 85 °C em dois diferentes tempos de contato, 10 minutos e 20 minutos. O teste foi realizado através do contato de cupons de 1 cm² das membranas com o inóculo na concentração de 10⁴ UFC/ mL, em temperaturas de 5, 25 e 35°C e a análise dos cupons após 24h, 48h e 72h de contato. A quantidade de células aderidas de *Escherichia coli* para ambas as membranas foi de 4 log UFC/ cm² para as primeiras 24h de contato, chegando até 6 log UFC/cm² após 72h de contato para a temperatura de 35°C. Para *Pseudomonas aeruginosa*, o comportamento de adesão foi similar, onde a maior quantidade chegou à 6,25 log UFC/cm² após 72h de contato para a temperatura de 25°C. Para avaliar a eficiência dos agentes sanitizantes, os cupons foram submetidos ao processo de adesão dos microrganismos e após 24 horas de contato na temperatura de 35°C foram colocados em contato com a solução

sanitizante à base de ácido peracético 0,1%, 0,2% e água quente à 85°C durante 10 e 20 minutos. Os sanitizantes utilizados ofereceram grande eficiência na redução das bactérias aderidas nas membranas. A concentração do sanitizante químico mais efetivo foi 0,2% para 10 e 20 minutos de contato, onde cerca de 80% dos cupons tiveram redução de $> 4 \text{ Log UFC/cm}^2$. A água na temperatura de 85°C em ambos os tempos de contato (10 minutos e 20 minutos) também ofereceu grande eficiência na redução logarítmica dos microrganismos, onde 100% dos cupons apresentaram redução $> 4 \text{ Log UFC/cm}^2$.

ABSTRACT

The high consumption of mineral water has leveraged many studies regarding microbiological, in several Brazilian regions. Papers reveal that the vast majority of Brazilian bottled waters and water from artesian wells have microbiological contamination, causing great concern about the quality of water being consumed. Among the processes for treatment of mineral water in order to meet business requirements and laws is microfiltration. The process consists in the use of polymer membrane filters, where the microorganisms are withheld (mechanical barrier). According to Resolution RDC 275/2005 of National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA) microorganisms *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, are inserted, along with other bacteria such as *Enterococcus*, *Clostridium perfringens* and total coliforms under control of microbiological characteristics of mineral waters. Due to the use of membrane filters to control these microorganisms, there is the need to perform sanitization filters to prevent the proliferation of microorganisms on the surface, preventing the clogging of the pores of the membrane and process contamination. The sanitizing basis of peracetic acid and hot water are the main agents sanitizers available in the industry of mineral water to equipments sanitize. This study aimed to evaluate the microbial biofilm formation of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in polymeric membranes of polyamide and polyethersulfone membranes and the sanitizing efficiency process with of peracetic acid 0.1%, 0.2% and hot water at 85 °C in two different contact times, 10 minutes and 20 minutes. The test was conducted through the contact of coupons with 1 cm² of the membranes in the inoculum with concentration of 10⁴ CFU /mL, at temperatures of 5, 25 and 35 °C and an analysis of the coupons after 24h, 48h and 72h of contact. The amount of *Escherichia coli* cells attached to both membranes was 4 log CFU /cm² for the first 24 hours of contact, reaching 6 log CFU /cm² after 72 hours of contact to a temperature of 35 °C. For *Pseudomonas aeruginosa*, the adherence behavior was similar, where the largest amount reached 6.25 log CFU /cm² after contact for 72 hours at 25 °C. To evaluate the effectiveness of sanitizing agents, the coupons were subjected to the adhesion of microorganisms and after 24 hours of contact at 35 °C were placed in contact with the sanitizing solution based on peracetic acid 0.1%, 0.2% and hot water at 85 °C for 10 to 20 minutes. The sanitizers used offered high efficiency in reducing bacteria attached on the membranes. The concentration of chemical sanitizer most effective was 0.2% for 10 and 20 minutes of contact, where about 80% of the coupons was reduced by > 4 Log CFU/cm². The water

temperature at 85 °C in both contact times (10 and 20 minutes) also offered greater efficiency in logarithmic reduction of microorganisms, where 100% of the coupons showed a reduction $> 4 \text{ Log UFC/cm}^2$.

1 INTRODUÇÃO

Água mineral natural é toda água obtida diretamente de fontes naturais ou artificialmente captadas, de origem subterrânea, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de sais minerais (composição iônica) e pela presença de oligoelementos e outros constituintes.

Em 2008, o consumo mundial de água mineral foi de 218 bilhões de litros, crescimento de 5% em relação à 2007 e 27,9% em relação ao consumo mundial de 2003. A perspectiva para 2011 seria de aproximadamente 239 bilhões de litros. (LAFIS, refrigerante e água mineral setembro de 2010).

Segundo estatísticas da Lafis de 2011, o Brasil se coloca na 9ª posição mundial no quadro de produtores de água mineral, com perspectiva para 2011 de 7,9 bilhões de litros. A perspectiva para 2012 e 2013 está respectivamente em 8,78 e 9,81 bilhões de litros de água mineral produzida.

Com o rápido crescimento do consumo de água engarrafada no Brasil e no mundo, pela opção do estilo saudável de vida, as pessoas estão cada vez mais procurando por qualidade e os produtores, engajados com o aperfeiçoamento dos processos que englobam o envase da água.

Uma das grandes preocupações dos produtores de água engarrafada é garantir a qualidade microbiológica do produto que será envasado. A Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), descreve que “a água mineral envasada não deverá apresentar risco à saúde do consumidor e estar em conformidade com as características microbiológicas”, como ausência de *Escherichia coli*, ausência ou < 1UFC/100 mL de coliformes totais, *Enterococos*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringes*.

A presença da microbiota natural tem alavancado o número de questões e debates sobre o efeito na saúde. Entretanto, a água mineral natural não deve ser submetida a algum tipo de desinfecção química que modifique ou elimine seus componentes biológicos e deverá apresentar composição química equivalente à da água emergente da fonte (SENIOR e DEGE, 2005).

A partir do aumento das exigências da qualidade microbiológica da água, pelos consumidores e pelas agências regulamentadoras, tem-se observado um grande crescimento da utilização da tecnologia de membranas para retenção de microrganismos, como sistemas de microfiltração antes do envase da água.

O sistema de microfiltração é composto por filtros com membranas poliméricas, que conseguem efetuar a retenção mecânica dos microrganismos presentes na água, evitando a presença indesejável dos mesmos na água a ser envasada.

O tempo do processo de filtração da água pode variar dentre as indústrias produtoras. Este tempo depende do volume diário a ser envasado. Grande parte das maiores indústrias produtoras, tem sua produção de envase de no mínimo 8 horas por dia de segunda à sexta-feira.

Após o processo de filtração da água mineral, devido à atividade de retenção microbiana, recomenda-se a sanitização da membrana, caso contrário, há grande probabilidade de desenvolvimento de biofilmes microbianos, causando o entupimento precoce das membranas, aumentando o custo de filtração para os produtores.

Não se encontram muitos dados com relação à quantidade e formação de biofilme microbiano na superfície das membranas após um processo de filtração de água mineral e após o tempo de parada do sistema, assim como o procedimento ideal de sanitização das membranas, para garantir a ausência de microrganismos vivos, evitando a proliferação durante o processo e no tempo de parada.

O presente estudo teve por finalidade avaliar a adesão e formação de biofilmes microbianos de *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502 na superfície de membranas de poliamida e polietersulfona e seu controle por agentes sanitizantes como o ácido peracético 0,1%, 0,2 % e água aquecida à 85°C.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Qualidade microbiológica da água mineral

Água mineral natural pode ser claramente diferenciada de água potável pela sua natureza, caracterizada por seu conteúdo mineral (traços de elementos ou outros constituintes), em alguns casos pelo benefício à saúde; e pelo fato de não ser tratada, preservando suas qualidades originais de água subterrânea.

Os indicadores de qualidade da água mineral incluem os coliformes totais, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *P. aeruginosa* e anaeróbios sulfitos redutores (SENIOR; DEGE, 2005). A Resolução RDC nº 275/05 da Anvisa regulamenta as exigências da água mineral envasada com relação ao controle destes microrganismos, como a ausência de *Escherichia coli* e ausência ou < 1 UFC / mL de *Enterococos*, *P. aeruginosa*, *Clostridium perfringes* e coliformes totais (ANVISA, 2005)

Escherichia coli foi considerada durante muito tempo o mais apropriado indicador da presença de bactérias enteropatogênicas na água. A mais significativa mudança nas últimas duas décadas é o geral reconhecimento que o teste de coliformes incluindo *Escherichia coli* em rede de abastecimento de água tratada não é mais uma medida de significância de inocuidade, mas um indicador de eficiência de tratamento. (GLEESON; GRAY, 1997).

Há duas razões para o monitoramento de *Pseudomonas aeruginosa* em água. De um lado como indicador de vulnerabilidade e/ou inadequado controle do ambiente de engarrafamento, por outro lado, como um patógeno oportunista.

Dias e Farache Filho (2007), avaliaram a qualidade microbiológica de 69 amostras de água mineral natural, não carbonatada de 17 marcas comercializadas em supermercados de Araraquara, em garrafas individuais de 330 mL e 600 mL. Das amostras analisadas, 8,7% apresentaram-se contaminadas por um ou mais dos indicadores (*E. coli*, Coliformes Totais, *Enterococos*, *P. aeruginosa* e Bactérias Totais). 58% das amostras provenientes de doze marcas estavam em desacordo com um ou mais padrões, demonstrando qualidade duvidosa para consumo humano.

Alves et al (2000), avaliaram a qualidade microbiológica da água potável e de diferentes marcas de águas minerais comerciais destinadas ao abastecimento público da cidade e de poços de diversas localidades da cidade de Marília, quanto a presença de

coliformes totais e fecais. Apenas 5,5% das amostras coletadas estavam contaminadas por coliformes totais, sendo que 94,5% estavam aptas para o consumo.

Sant'ana et al (2002) analisaram microbiologicamente quarenta e quatro amostras de água mineral envasadas, de diferentes marcas, originárias do Estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais, comercializadas em Vassouras, RJ, dentre os meses de Julho e agosto de 2002. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Clostrídios* sulfito redutores a 46°C, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococos*. A contaminação por coliformes totais e *E.coli*, foi detectada em 25% e 20,4% das amostras, respectivamente.

Dias et al (2002), avaliaram a qualidade microbiológica de águas minerais e de água do sistema municipal da cidade de Maringá no Paraná, e constataram que 64,7% das amostras de água mineral que foram caracterizadas microbiologicamente havia contaminação, sendo 7% *Escherichia coli*.

Iwersel et al, (2009), observaram variação de log de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral de 3 tipos de embalagens e 4 marcas distintas da região de Curitiba e Santa Catarina, variando de <1,8 Log até 3,38 Log. Verificaram após 180 dias de estocagem a presença do microrganismo.

Tancredi, Cerqueira e Marins (2002) avaliaram a qualidade de 74 amostras de águas minerais comercializadas e distribuídas na cidade do Rio de Janeiro e observaram que 18,9% estavam em desacordo com os padrões microbiológicos da legislação vigente. Dentre as amostras contaminadas 42,9% tinham presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

Foram analisadas por Resende (2008) 10 marcas de Água Mineral de 500 mL comercializadas e engarrafadas no Distrito Federal 10% das amostras apresentaram presença de coliformes totais.

2.1.1 *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

A existência de cepas patogênicas de *Escherichia coli* foi descoberta em 1980, quando se determinou sua associação com diarreias em bezerros. Estudos desenvolvidos nas décadas de 1920 e 1930 já sugeriam seu envolvimento com diarreias infantis, mas foi apenas na década de 1940 que o conceito de *E. coli* como agente etiológico de diarreia em humanos foi efetivamente aceito (DOYLE e PADHYE, 1989).

É uma espécie de bactérias que normalmente habita o estômago de ruminantes e o intestino de humanos. Quando *E. coli* (cepas patogênicas) é consumida em água, pode

causar doenças gastrointestinais. Mutações podem levar às espécies que causam diarreia pela liberação de toxinas. Em casos severos pode levar à diarreia com sangue e até a morte. *Escherichia coli* é a espécie mais comum dos tipos de bactérias coliformes. A detecção de *E.coli* é definida pela evidência de contaminação fecal (ENCYCLOPEDIA OF PUBLIC HEALTH, 2002).

A espécie *Escherichia coli* pertence ao gênero *Escherichia*, dentro da família Enterobacteriaceae. Morfologicamente são bastonetes Gram negativos 1,0 -1,5 µm de largura e 2,0 – 6,0 µm de comprimento. É aeróbio facultativo, não esporulado e capaz de fermentar a glicose com produção de ácido e gás. Também pode crescer realizando respiração anaeróbia, utilizando NO₃, NO₂ como receptores finais de elétrons. Esta versatilidade dá à bactéria a habilidade para se adaptar no intestino (anaeróbico) e em habitats externos (aeróbico ou anaeróbico) (ENCYCLOPEDIA OF PUBLIC HEALTH, 2002). Cresce em meios comuns; a temperatura ideal para crescimento é de 37°C. São oxidasas negativas podendo usar o acetato como única fonte de carbono e catalase positiva e são fermentadoras de lactose.

São utilizadas como indicadores de higiene nos processos de fabricação e são indicadores de falhas no controle da contaminação de alimentos após processos de pasteurização (MORELLI, 2008).

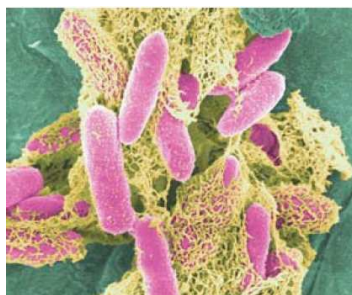


Figura 1: *Escherichia coli*

Fonte: Encyclopedia of Public Health, 2002

Pseudomonas aeruginosa pertence à classe das Proteobactérias, à família das Pseudomonaceae e ao gênero *Pseudomonas*. Sua Taxonomia é baseada na conservação de macromoléculas (16S ribossomal RNA).

Esta bactéria é de vida livre, comumente encontrada em solo e água. Entretanto, ela ocorre regularmente em superfícies de plantas e ocasionalmente em superfícies de animais. Membros deste gênero são bem conhecidos pelos microbiologistas de plantas,

pois são um dos poucos grupos de bactérias que verdadeiramente são patógenos para as plantas. Entretanto a *Pseudomonas aeruginosa* é reconhecida por ser um patógeno oportunista de relevância clínica. Vários estudos epidemiológicos indicam a resistência deste microrganismo à diversos antibióticos (TODAR, 2008).

Pseudomonas aeruginosa morfologicamente são bacilos Gram negativos com 0,5 a 0,8 μm de diâmetro e de 1,5 a 3,0 μm de comprimento. Apresentam-se de maneira isolada ou agrupada em dois ou curtas cadeias.

É uma bactéria aeróbia, não formadora de esporos, não fermentadora, derivando sua energia de processos oxidativos de carboidratos e catalase positiva. Pode crescer em meios de cultura contendo somente acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Além disso, embora sendo um aeróbio, pode crescer anaerobicamente e em algumas circunstâncias usar o nitrato como aceptor de elétrons (respiração anaeróbica).

P. aeruginosa é cultivada a 42 °C, mas também pode ser cultivada a 4 °C ou a 46 °C. A temperatura ótima de crescimento está compreendida entre 30 e 37 °C. É cultivada facilmente nos meios de cultivo ordinários (agar Nutriente, agar Triplic Soy Agar, agar Mueller-Hinton, agar Sangue) e sobre inúmeros meios utilizados para estudos das enterobactérias, como Drigalski, MacConkey, Hektoen, SS. (GOMES, 2008).

Esta bactéria requer poucas quantidades nutricionais para o crescimento. Foi observado o crescimento em água destilada e resistente à altas concentrações de sais, fracos antisépticos e muitos antibióticos comumente utilizados (TODAR, 2008).



Figura 2: *Pseudomonas aeruginosa* em meio Agar (TSA)

Fonte: Todar, 2008

2.2 Tratamentos empregados no processo de água mineral

Há uma grande variedade de tratamentos disponíveis para atender as exigências microbiológicas antes do processo de envase da água (SENIOR e DEGE, 2005 - a). Em

prática, cada uma das opções de tratamento pode ser considerada como uma barreira múltipla. Ao contrário de água de abastecimento público, a água mineral não emprega múltiplas barreiras que produzem resíduos de desinfecção. No entanto, múltiplas barreiras como o uso de desinfetantes a base de cloro não são aplicáveis para água mineral. Há 4 barreiras básicas de opções de tratamento empregadas na indústria de água envasada, a ozonização, osmose reversa, microfiltração e destilação (SENIOR e DEGE, 2005 - b).

Na indústria de água mineral, a microfiltração é geralmente utilizada como uma barreira múltipla para a microbiota. Os filtros empregados neste processo são classificados como filtro de membrana redutores microbiológicos (0,45 μm) ou esterilizantes (0,2 μm). Atualmente, algumas engarrafadoras brasileiras têm utilizado filtro de membrana de 0,45 μm e 0,20 μm no processo para retenção de microrganismos.

2.3 Microfiltração de água

2.3.1 Histórico

A filtração tem sido utilizada há anos como principal agente de controle microbiológico de soluções farmacêuticas e biológicas. Provavelmente os primeiros filtros designados para remoção de bactéria de soluções foram construídos por Pasteur e Chamberlain em. Estes foram produzidos na forma de fibra oca, ranhurado pelo calor. Mais tarde, placas com fibras de asbestos, desenvolvidos na Alemanha (Seitz filters), passaram a ser utilizadas. Em 1922, Zsigmondy e Buchmann introduziram o filtro de membrana composto por ester de celulose para a remoção de bactérias de soluções. Desde então, a tecnologia dos filtros de membrana vem avançando no mercado, particularmente nas últimas décadas (BLOCK, 1977).

Atualmente, a filtração microbiológica vem sendo muito utilizada para a filtração de água mineral, uma vez que esta não deve ser esterilizada por outros meios, por exemplo, o calor (esterilização ou pasteurização) e a sanitização através de produtos químicos.

2.3.2 Membranas filtrantes

As membranas filtrantes comerciais são preparadas a partir de materiais poliméricos com características químicas e físicas variadas. Possuem diferentes

morfologias e se classificam como densas e porosas e as mesmas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. Vide **Figura 3**.

De acordo com Habert, Borges e Nóbrega (2006), dois parâmetros são empregados para se caracterizar membranas, como a natureza morfológica e parâmetros relativos as suas propriedades de transporte como a permeabilidade a gases e líquidos, bem como a sua capacidade seletiva.

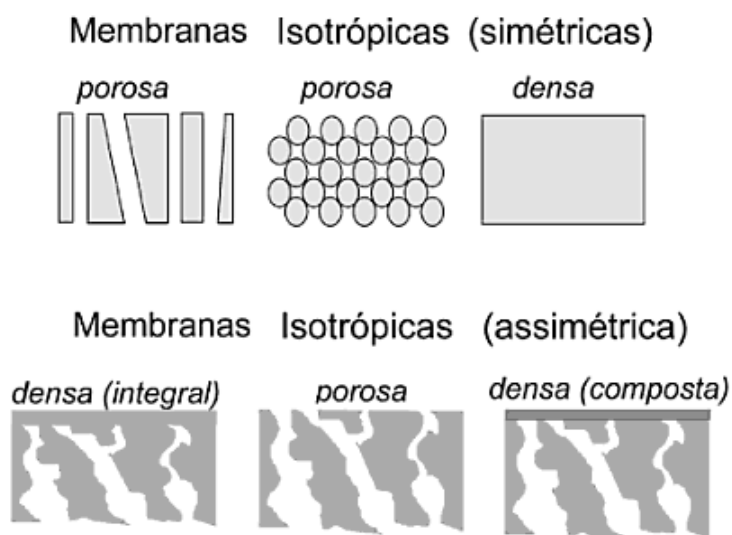


Figura 3: Morfologia de membranas sintéticas

Fonte: HABERT et al, 2006

Para que ocorra o transporte de um elemento através de uma membrana é necessário a ação de uma força motriz. O gradiente de potencial químico e/ou gradiente de potencial elétrico é uma espécie de força motriz utilizada pelas membranas comerciais. De acordo com a morfologia das membranas, o transporte dos elementos pode ocorrer por convecção ou difusão (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

O processo de microfiltração utiliza a pressão como o gradiente de força motriz para o processo de separação, onde varia de 0,5 a 3 atmosferas. Este sistema opera de duas formas distintas: operação com filtração frontal, onde somente há fluxo perpendicular à superfície da membrana, chamado de “*dead end filtration*” e a operação com filtração tangencial, onde a alimentação escoia tangencialmente à superfície da membrana, chamado também de “*cross flow*” (DAVIS, 1992).

Uma membrana filtrante utilizada para microfiltração na indústria de água mineral possui poros altamente uniformes, é rígida e com estrutura contínua com espaços regulares. Quando um líquido é filtrado, todas as partículas e microrganismos maiores que o tamanho dos poros, será retido na superfície. Neste processo geralmente são utilizadas as membranas onde somente há fluxo perpendicular.

O primeiro mecanismo no processo de filtração de uma membrana com o fluxo perpendicular é a retenção mecânica de todas as partículas maiores que os poros na sua superfície. A uniformidade do tamanho do poro permite definir limites de retenção de partículas. Devido a este fato, podem ser classificadas como filtros de retenção absoluta, onde nenhum microrganismo ou partícula que excedam o tamanho do poro poderá atravessá-lo. Na **Figura 4** é mostrada a faixa de tamanho dos poros dos filtros de membrana da microfiltração.

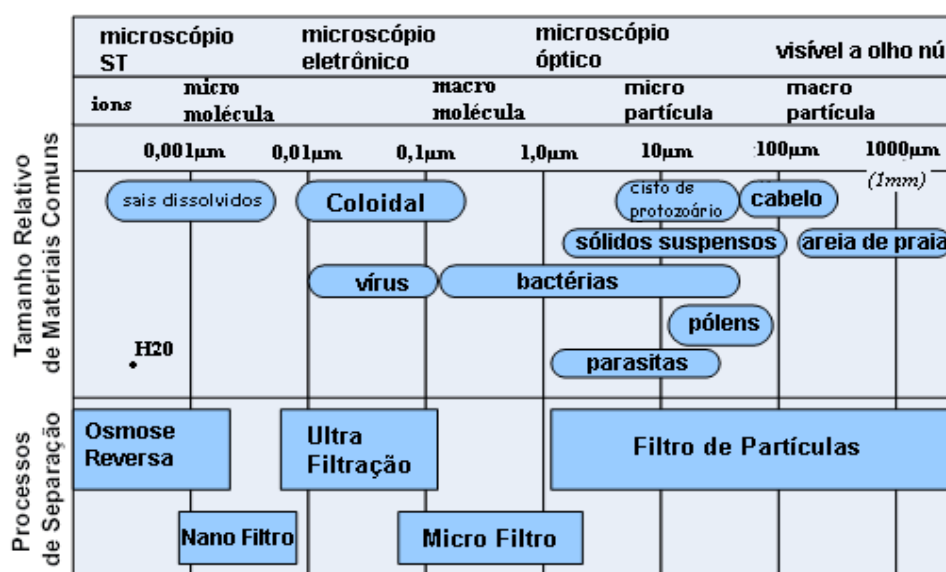


Figura 4: Diagrama básico do transporte de massa em uma membrana.

Fonte: FSF metalúrgica, o filtro e o tamanho dos contaminantes (2010).

Até 1960, a filtração em membranas com porosidade de 0,45 μm era considerada como “esterilizante” e foram utilizados com sucesso em filtração de soluções parenterais. Os filtros eram qualificados utilizando *Serratia marcescens* (0,6 x 1 μm), a bactéria padrão para qualificar analiticamente as membranas utilizadas para testar a qualidade da água. No meio da década de 60, Browman do Food & Drug Administration (FDA), observou que um meio de cultura após filtração estéril em 0,45 μm poderia ser

contaminado com um microrganismo, capaz penetrar nos poros de $0,45\ \mu\text{m}$ da membrana, repetidamente em pequenos números a níveis de desafio acima de 10^4 - $10^6/\text{cm}^2$ (SCHWARTZ, 1998).

Browman também observou que o próximo filtro de membrana com porosidade menor ($0,22\ \mu\text{m}$) tinha eficiência de reter este microrganismo com níveis de desafio similares. Este microrganismo foi identificado como *Pseudomonas diminuta* (*Brevundimonas diminuta*) com dimensão de $0,3 \times 0,6$ - $0,8\ \mu\text{m}$ e registrado como ATCC 19146. Esta espécie tem sido aceita largamente pelos fabricantes de filtro de membranas como microrganismo padrão para qualificação de filtros esterilizantes (SCHWARTZ, 1998).

Há uma série de vantagens e desvantagens na utilização dos filtros de membrana para microfiltração nos processos de água mineral. Dentre as principais vantagens pode-se destacar a redução de microrganismos, a eficiência de filtração é independente do diferencial de pressão. Assim como as vantagens, tem-se algumas desvantagens da utilização de membranas como a pequena capacidade de retenção de sujidades, por ser um filtro de superfície e a necessidade de um maior cuidado asséptico devido a retenção e presença de microrganismos.

As membranas filtrantes possuem uma série de características a serem monitoradas para garantir a eficiência de filtração. Dentre elas está a vazão de filtração, onde é função da área filtrante, do diferencial de pressão e viscosidade do fluído.

A vazão é diretamente proporcional ao diferencial de pressão, no caso de líquidos limpos e a área de filtração; o decaimento da viscosidade do fluído (pelo aumento da temperatura) terá um proporcional aumento na vazão e a resistência do fluxo oferecido pelo meio filtrante é, de fato, relatado pelo volume de poros abertos e tamanhos dos poros. O tamanho e a quantidade de contaminantes captadas pelo filtro afetam a quantidade de poros abertos, reduzindo a vazão de filtração (BLOCK, 1977).

Os elementos filtrantes da 3M, sendo membrana ou cartucho de profundidade são considerados entupidos quando o seu diferencial de pressão chega a $2,5\ \text{kgf/cm}^2$, ou quando o seu fluxo decai no ponto em que é impraticável a continuação do processo.

Quando um fluído apresenta grande quantidade de partículas, além de microrganismos, há a necessidade de agregar mais um filtro com porosidade maior antes do filtro microbiológico, a fim de aumentar a vida útil do filtro final, tornando o processo de filtração mais econômico.

Outra característica dos filtros de membrana é o teste de integridade, cujo objetivo é determinar a presença de poros maiores que o especificado ou defeituosos que comprometem a capacidade de retenção do filtro. O procedimento do teste deverá ser correlacionado com a retenção bacteriana. O teste de retenção bacteriana é um teste destrutivo e não poderá ser utilizado para verificar a integridade do filtro que será utilizado na produção (SCHWARTZ, 1998).

Para verificar a integridade das membranas, existe um teste não destrutivo chamado de Ponto de Bolha. Este teste é caracterizado pelo valor da pressão requerida para forçar o líquido a sair dos poros da membrana, através da pressurização do sistema de filtração, onde o valor da pressão do ponto de bolha é caracterizado pelo o borbulhamento constante na saída do filtro. Excedendo a pressão do ponto de bolha (que é dado pelo fabricante do filtro de acordo com o tamanho do poro), o filtro estará íntegro (SCHWARTZ, 1998). Na **Figura 5**, está esquematizado um gráfico que caracteriza o aumento de vazão do fluxo de ar em relação ao teste de integridade.

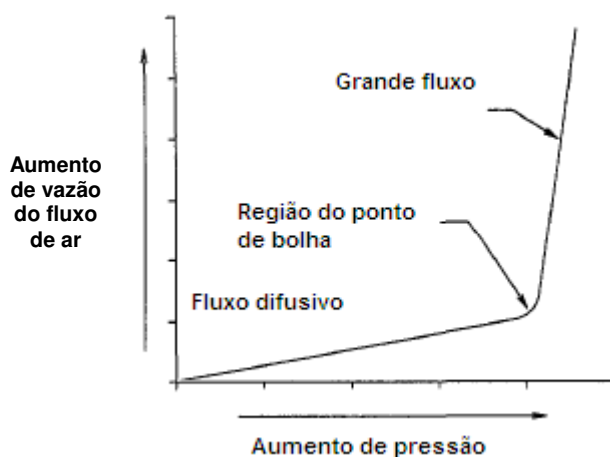


Figura 5: Gráfico que caracteriza o aumento de vazão do fluxo de ar em relação ao teste de integridade

Fonte: SCHWARTZ, 1998

2.4 Formação de biofilme microbiano

Uma das primeiras teorias da formação de biofilme foi descrita por Marshal Stout e Mitchell (1971), mostrando que a formação do biofilme é um processo que ocorre em

duas fases, sendo na primeira, o processo ainda reversível, em função da adesão do microrganismo na superfície, que ocorre por forças de Van der Waals, interação hidrofóbica e atração eletrostática. Durante este estágio, a bactéria apresenta movimento browniano, podendo ser removida por rinsagem. Na segunda etapa, por meio de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas e covalentes, e interações hidrofóbicas, ocorrem a interação física da célula com a superfície, com a produção de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzida pela bactéria, que é denominada matrix de glicocálix. Neste processo, as fimbrias poliméricas ligam a célula bacteriana ao substrato, tornando-se difícil remoção do biofilme. Este processo é exibido na **Figura 6**.

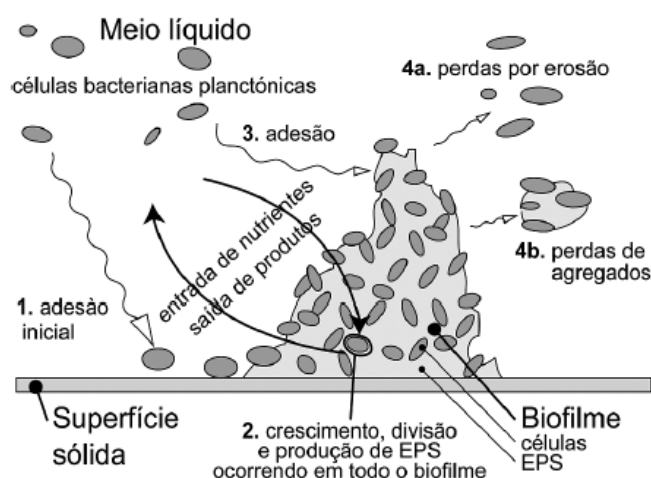


Figura 6: Processos envolvidos na formação de biofilmes

Fonte: Xavier et al (2005)

Segundo Andrade, Bridgeman e Zottola (1998), para considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas/cm², enquanto Ronner e Wong (1993), consideram 10^5 células/cm².

Jayasehara et al. (1999), analisaram a capacidade de formação de biofilme em superfície interior de três marcas de embalagem de água mineral não carbonatadas. Através da microscopia eletrônica foi possível observar que havia em torno de 10^7 células/cm², com evidência de microcolônias. Após a realização de duas rinsagens (com água destilada e com tween 80, um tensoativo hidrofílico) cerca de 80-90% das bactérias foram removidas.

Yun et al (2006), compararam a formação de biofilme microbiano na superfície de membranas de PVDF de reatores que operam em condições aeróbicas e anaeróbicas. Através de análise por microscopia eletrônica, foi possível observar que o biofilme nas condições anaeróbicas foi mais fino que o aeróbico, no entanto o biofilme anaeróbico foi mais espalhado na membrana e mais denso, resultando no entupimento da membrana.

Ghayeni et al (1998), avaliaram as condições de adesão de espécies de *Pseudomonas* em superfície de membranas de osmose reversa (acetato de celulose, polivinil álcool, aromático e amido de polipiperazina) e constataram que há um grande efeito da condutividade e pH no crescimento de biofilmes. Houve baixo crescimento de biofilme com a presença de baixa condutividade (água deionizada).

Segundo Pang et al (2005), a aderência de biofilmes em superfície de membrana de osmose reversa está diretamente ligada à característica hidrofóbica das membranas e microrganismos e ao potencial zeta (cargas negativas), onde espécies com maior carga negativa que a membrana, são repelidas, e, portanto menor formação de biofilmes.

Pompermayer e Gaylarde (2000) verificaram a adesão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, isolados da carcaça de frango em superfície de polipropileno à 12°C e 30°C. *Escherichia coli* teve maior aderência nos cupons de polipropileno que *Staphylococcus aureus* em ambas as temperaturas. *Escherichia coli* teve maior formação de biofilme na temperatura de 30°C.

De acordo com a pesquisa de Pasmore et al (2005), a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em membranas de ultrafiltração aumenta com a rugosidade de hidrofobicidade. O entupimento das membranas é reduzido quando a carga de contaminantes da superfície é minimizada e é aumentado com o aumento das cargas, positivas ou negativas.

Marques et al (2007) analisaram a capacidade de formação de biofilme em superfície de aço inoxidável e vidro por *Staphylococcus aureus*. A contagem de bactérias após 15 dias de contato foi de 10^8 UFC/cm² e 10^7 UFC/cm² no aço inoxidável e vidro respectivamente.

2.5 Métodos de avaliação de biofilmes

Os métodos empregados para caracterização de biofilmes são divididos em métodos visuais e não visuais. Os métodos visuais são a microscopia de contraste, de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

A microscopia de contraste acompanha o desenvolvimento do biofilme em tempo real em superfície transparente e a de epifluorescência quantifica as células aderidas à superfície. O alaranjado de acridina é utilizado para visualização de células viáveis e não viáveis.

A microscopia eletrônica é a mais indicada para avaliar a interação microbiana na matriz do biofilme. A fixação das amostras é utilizada utilizando glutaraldeído, paraformaldeído e o ósmio, onde a amostra é rapidamente congelada para evitar danos à células pelos cristais de gelo (COSTA, 1999).

Dentre os métodos não visuais destaca-se a medida da impedância e bioluminescência. A impedância é avaliada através da medição da condutividade, pela mudança da resistência do meio. Já a bioluminescência é medida pela quantidade de ATP, trifosfato de adenosina, que é gerado pela oxidação de moléculas alimentares como glicose, ácidos graxos e aminoácidos (MACEDO, 2000).

2.6 Métodos de controle de microrganismos

2.6.1 Controle de microrganismos pelo calor

A resistência ao calor de microorganismos é a maior consideração em estabelecer temperaturas e tempos de processos. Em temperaturas de 60°C a 80°C, considerando o tempo apropriado para cada tipo de microrganismo, a maioria das células de bactérias vegetativas é inibida. Em alguns casos altas temperaturas podem ser necessários para inativar microrganismos termofílico ou termodúrico (BANWART, 1989).

Esporos são em torno de 100.000 vezes mais resistentes ao calor que células vegetativas (GOULD e DRING, 1977).

De acordo com Algie (1980); Gould e Dring (1977) a resistência ao calor de esporos bacterianos podem resultar da desidratação do protoplasma central. A mineralização aumenta a resistência ao calor de esporos bacterianos (BEAMAN e GEHARDT, 1996; BENDER e MARQUIS, 1985), mas a desidratação foi um fator dominante. Ácidos podem interferir na osmoregulação e render a sensibilidade ao calor de esporos (GOULD 1977).

O aumento da temperatura de incubação aumenta a resistência ao calor de células vegetativas bacterianas e leveduras (El Banna e Hurst 1983; Katsui 1982).

As características físicas e químicas do meio em suspensão em que os microrganismos sofrem o calor influenciam a resistência ao calor. A 70°C, o tempo de redução decimal de esporos de *Bacillus licheniformis* foi quase dobrado quando 4% de sal foi adicionado ao meio (BELL e DELACY 1984).

A termoestabilidade de esporos de *C. botulinum* é reativamente proporcional a concentração de sacarose do meio de suspensão. Com o aumento da concentração de sacarose, a resistência ao calor aumenta. A alta resistência de *S. cerevisiae* em sacarose que em frutose ou glicose foi relatado por Torreggiam e Toledo (1986). A sacarose protege várias células vegetativas do calor (KWAIST e VERRIPS 1982).

Há uma tendência das proteínas protegerem os microrganismos dos efeitos letais do calor. Petonas, extrato de leveduras e albuminas podem prover a proteção de certos organismos.

Várias substâncias antimicrobianas tendem a aumentar a destruição dos microrganismos pelo calor. Sorbato de potássio e benzoato de sódio agindo sinergicamente com calor inativam vários fungos (BEUCHAT 1981). Na **Tabela 1** é apresentado o tempo de redução decimal pelo calor de *Salmonella senftenberg* 775W, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Tabela 1: Tempo de redução decimal (D) para calor de vários microrganismos

Organismos	Meio de suspensão	Valor D	
		Temperatura (°C)	Minutos
<i>Salmonella senftenberg</i> 775W	creme	60	11,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	creme	60	7,7 – 7,8
<i>Escherichia coli</i>	Leite	57,3	1,3
	Sorvete	57,3	5,1

Fonte: Cook e Gilbert (1968)

2.6.1.1 Efeito do calor em células microbianas

Embora o calor tenha sido utilizado por muitos anos como um método de esterilização, o primeiro evento letal em inativação térmica de microrganismos não tem sido determinado. A desnaturação e coagulação de proteínas, quebras nos ácidos

desoxiribonucleicos (DNA), lesões nos ácidos ribonucléicos (RNA), e danificação na membrana citoplasmática tem sido sugerido como possibilidades de morte microbiana (BANWART, 1989).

A desnaturação ou coagulação de proteínas envolvem a respiração celular ou multiplicação celular usualmente é sugestionado como causa da morte. No range de 50°C à 60°C, o vazamento de componentes celulares suspensos no meio indica que há um perigo para a barreira permeável da célula. Scheie e Enhrenspeck (1973) mostraram que o calor causa desnaturação de proteínas em células de *E.coli*. causando a fraqueza da camada peptidoglicana, que seria suficiente para prevenir a multiplicação.

Russel e Harries (1968) mostraram que células não formadoras de esporos como a *E.coli*, a degradação do RNA é explicado pelo calor, que induz a morte. O efeito do calor na *E.coli* causa a quebra de partes externas da membrana, resultando em uma parcial ruptura da função da barreira permeável da membrana (TSUCHIDO, 1985). Ambos RNA e lesão da membrana foram reportados em *Pseudomonas fluorescens* (GRAY, WITTER e ORDAL 1973).

Segundo Hui (2005) a água quente de 76 à 85°C é freqüentemente utilizada como agente sanitizante. A relação tempo-temperatura seria de no mínimo 15 minutos para água à 85°C e de 20 minutos para 80°C.

2.6.2 Controle de microrganismos por sanitizantes químicos

Os sanitizantes químicos possuem inerentes diferenças em suas atividades nos microrganismos. Surpreendentemente, pouca informação é disponibilizada, entretanto, alguns dados de relação estrutura/função dos ácidos orgânicos, agentes oxidantes, ou compostos fenólicos são apresentados

Fatores microbianos que podem afetar a atividade antimicrobiana incluem a resistência de microrganismos, número inicial, estágio de crescimento, composição celular (reação de gram), e exposição prévia ao estresse. Por exemplo, sabe-se que os esporos bacterianos são geralmente mais resistentes aos antimicrobianos químicos que células vegetativas e que as bactérias gram negativas são frequentemente mais resistentes que as bactérias gram positivas. Recentemente tem sido muito pesquisado o efeito do ambiente dos fatores de stress, como calor, frio, e baixo pH de ácidos orgânicos, no desenvolvimento da resistência para um mesmo ou outro subsequente agente de stress.

A utilização de sanitizantes químicos na indústria alimentícia é bastante difundida. O seu uso tem por finalidade destruir os microrganismos na forma vegetativa encontrada nas mais diversas superfícies, como tubulação, equipamentos utensílios e manipuladores.

A utilização destes produtos em sistemas de microfiltração depende basicamente da compatibilidade química com o meio polimérico dos filtros, assim como o conjunto de fatores, como tempo de contato, temperatura e concentração.

O ácido peracético é o mais utilizado pelas indústrias alimentícias pelo fato de não reagir com outras substâncias, não ter impacto ambiental e ser de grande eficiência na remoção de biofilmes (ROSSONI e GAYLARD, 2000).

2.6.2.1 Ácido peracético (APA)

O ácido peracético é composto por peroxigênio que exibe boa atividade antimicrobiana. Este composto, freqüentemente se refere como o peróxido de ácido acético, sendo um forte agente oxidante. O líquido concentrado do ácido peracético tem um forte odor pungente, é solúvel em água e usualmente contém estabilizantes que afetados pela alta temperatura e contaminação com íons metálicos. Tipicamente a formulação comercial de ácido peracético (4 a 40%) pode conter ácido acético, peróxido de hidrogênio, ácido sulfúrico, ácido fosfórico e/ ou estabilizantes. Em comparação com o peróxido de hidrogênio, o ácido peracético tem maior potência antimicrobiana, sendo efetivo a baixas temperaturas e baixas concentrações, não é reativo com catalase ou peroxidase, e é mais estável e efetivo bactericida na presença de material orgânico. (FMC CORP, 1981).

A eficiência microbiológica do ácido peracético foi primeiramente reportada por Freer e Novy em 1902. Os autores exibiram excelentes resultados bactericida e fungicida utilizando ácido peracético.

Os ingredientes deste produto se decompõem em água, oxigênio e ácido acético. Estes produtos não são tóxicos quando introduzidos em alimentos ou no ambiente e não afetam o gosto em sistemas de tratamentos abaixo das condições típicas (DAVIDSON e BRANEN 1972).

O preciso mecanismo da atividade antimicrobiana do ácido peracético é ainda investigada. O ácido peracético pode ter muitos outros materiais oxidantes. De acordo com Greenspan (1955), o ácido peracético não é afetado pela enzima catalase.

Davis et al (1980) verificaram que ácido peracético mata um microrganismo pela ruptura de grupos sulfidril e ligações dissulfeto de proteínas e enzimas pelo seu poder de oxidação. Também, foi sugerido que o sanitizante rompe a parede da célula bacteriana pela reação com proteínas, rompendo as funções quimiosmóticas da membrana (FRASER, 1987).

Pavlova e Kulikovskii (1978), em seus estudos com ácido peracético demonstrou que a alta atividade bactericida e esporocida foi causada pela ruptura da permeabilidade de células bacterianas.

Baldry e Frase (1988) mostraram que as propriedades esporocida do ácido peracético estão relacionadas com a desnaturação de proteínas.

A destruição de células bacterianas pelo ácido peracético pode ser agrupada em 3 diferentes mecanismos, como a desnaturação de proteínas da célula e interrupção do transporte celular, a inativação de enzimas essenciais para o metabolismo da célula e a ruptura das membranas celulares e quebra da sua permeabilidade.

De acordo com Dychdala 1988, o ácido peracético é um dos mais efetivos agentes antimicrobianos que controla uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactéria, fungos, vírus e esporos microbianos.

Holah (1990) avaliou 12 sanitizantes utilizados em superfícies usando biofilme bacteriano desenvolvido em aço inox. Os autores concluíram que o ácido peracético foi o mais efetivo dos compostos testados.

De acordo com Bragulla e Lintner (1986), o ácido peracético é altamente eficaz para sanitizar membranas, pois passam facilmente através da membrana e são compatíveis com muitos materiais de membrana e se algum resíduo permanecer no equipamento não afetará o sabor no produto a ser processado.

Briñez et al (2006) avaliaram a eficiência da combinação de ácido peracético com peróxido de hidrogênio (Oxônia ativa, Ecolab) em *Staphylococcus* ssp, *Listeria* ssp e *Escherichia coli* utilizando teste de suspensão do padrão europeu UNE-EN-1276 com tempos de contato de 10, 20 e 30 minutos e concentrações de 0,05 – 0,4%. Em concentrações acima de 0,1%, o sanitizante apresentou >5 log UFC/mL de redução de todos os microrganismos em todos os tempos de contatos testados.

Souza e Daniel (2004) testaram a eficiência do ácido peracético na desinfecção de água e observaram efetiva inativação dos microrganismos com ácido peracético 5,0 mg/L com 15 minutos de contato (*Escherichia coli* teve redução > 6 logs).

A atividade germicida do ácido peracético é influenciada pela concentração em que é utilizado, o período de tempo de contato, a temperatura, e o pH são de importância significativa. Outros fatores podem ser considerados para a atividade do ácido peracético, e estes incluem o efeito da contaminação de material orgânico e o efeito da água dura.

Krzywicka (1971), em seu trabalho com organismos formadores de esporos, mostrou que *Bacillus cereus* foi eliminado em 3 minutos quando expostos em 0,3% de solução ácido peracético, mas 90 minutos foram requeridos para o mesmo efeito com 0,01%.

O ácido peracético tem grande atividade antimicrobiana em ambientes ácidos. Foi testado a 0,01% com *E. coli* em 500 ppm de água dura em diferentes valores de pH de 3,5 a 7,0 e produzidos ótimos resultados como 99,999% de morte com 30 segundos em todos os níveis de pH (DYCHDALA e KOROMA, 1986).

Baldry, 1983 testou a atividade esporocida em que um grande números de esporos não são completamente destruídos depois de 1h de contato a temperatura ambiente, a 85°C o tempo de morte pode ser reduzido para 5 minutos.

Dychdala 1988, avaliou a atividade bactericida do ácido peracético 0,2% à 5°C, segundo método de teste, AOAC, 13th ed., 4.023-4.032 (1980) para *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e verificou que 100% dos microrganismos foram eliminados em 30 e 60 segundos de exposição.

A matéria orgânica também influencia a atividade bactericida. O efeito do ácido peracético sobre *Mycobacterium bovis* foi evidenciado com 0,0125% em 10-20 minutos, mas na presença de fezes bovinas a concentração de produto foi aumentada para 0,05% para a mesma destruição destes microrganismos (PAVLAS, 1967).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo consistiu na avaliação da formação de biofilme microbiano em membranas de poliamida e polietersulfona, geralmente utilizadas no processo de filtração de água na indústria de alimentos e seu controle por sanitizantes como ácido peracético e água quente.

Destacam-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a compatibilidade química do agente sanitizante químico com as membranas de poliamida e polietersulfona;
- Avaliar o perfil da formação de biofilme de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* na superfície das membranas filtrantes;
- Avaliar a ação dos agentes sanitizantes frente aos biofilmes formados nas superfícies das membranas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de tecnologia de filtração da 3M do Brasil e no laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas.

4.1 Materiais

4.1.1 Membranas filtrantes utilizadas

As membranas filtrantes utilizadas foram membranas do fabricante 3M do Brasil, de material polimérico poliamida e polietersulfona com porosidade de 0,45 μm e 47 mm de diâmetro, com área disponível de filtração de 0,0013 m^2 . As membranas foram previamente esterilizadas em autoclave à 121°C durante 30 minutos no ciclo com exaustão lenta. A especificação das membranas está descrita na **Tabela 2:**

Tabela 2: Especificação das membranas

Nome do filtro de membrana	Fabricante	Material polimérico da membrana	Porosidade (μm)
BevASSURE II	3M	Nylon 66	0,45
BevASSURE PES	3M	Polietersulfona	0,45

Fonte: 3M, catálogos dos elementos filtrantes.

4.1.2 – Agentes sanitizantes

Foram utilizados neste trabalho solução de ácido peracético 0,1% (v/v) e 0,2% (v/v) a partir do produto químico comercial DIVOSAN FORTE (Jonhson Diversey) e água quente à 85°C. O Divosan forte é uma solução estabilizada de ácido peracético a 15 - 30%, peróxido de hidrogênio a 15 – 30% e ácido acético de 15-30%. As soluções foram preparadas com água destilada estéril à temperatura ambiente. Esta concentração foi baseada em testes realizados por Dychdala, 1988 (100% de eficiência na morte de *Escherichia coli* ATCC 11229 à 5°C pelo método AOAC, 13th ed, 4.023-4.032, 1980) e segundo recomendações do fabricante (para sistemas CIP 0,1-0,3% de processos alimentícios). Para água quente à 85°C foi utilizada água destilada estéril aquecida à 85°C em banho Maria. (HANDBOOK OF FOOD SCIENCE, TECHNOLOGY AND ENGINEERING, 1972).

4.1.3 Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram *Escherichia coli* ATCC 11229, pois é um microrganismo recomendado pela Portaria 15, da ANVISA 1988 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1988) para avaliação da ação antimicrobiana de sanitizantes para a indústria alimentícia e um dos microrganismos de controle da qualidade microbiológica da água mineral, segundo Resolução RDC 275/2005, da Anvisa e devido aos estudos realizados onde este microrganismo tem grande presença nas águas minerais engarrafadas e em poços e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502, que é também um dos microrganismos de controle da qualidade microbiológica da água mineral.

4.2 Métodos

4.2.1 Compatibilidade das membranas com a solução de ácido peracético a 2%

Para avaliar a compatibilidade química das membranas com a solução química foram realizados 3 testes na seguinte seqüência: 1) determinação do volume de água para enxágüe das membranas; 2) avaliação da compatibilidade química através do teste de integridade; 3) teste de integridade “ponto de bolha”. Os testes foram realizados em duplicata para a membrana de poliamida e polietersulfona.

4.2.1.1 Determinação do volume de água para enxágüe das membranas

Estes testes foram realizados para determinar a quantidade de água de enxágüe necessária para neutralizar o residual da solução de ácido peracético após processos de sanitização. Duas membranas de polietersulfona e poliamida, após o contato de 15 minutos, 30 minutos e 168 horas com o ácido peracético, foram submetidas ao enxágüe com água destilada, através do bombeamento e escoamento através das membranas.

A cada 100 mL de passagem de água foram mensurados o pH e a condutividade da água de saída do filtro. Estes parâmetros serviram como base para avaliar o volume de água necessária para eliminar o resíduo da solução química das membranas. Segundo especificação do fabricante, a vazão de água a ser utilizada na membrana de poliamida (BevASSURE II) é de 7 mL/min e para polietersulfona (BevASSURES PES) é de 33

mL/min. Foi utilizada uma bomba peristáltica com deslocamento positivo, que mantinha a vazão constante.

4.2.1.2 Compatibilidade das membranas com solução de ácido peracético 0,2 %

As membranas foram submetidas ao contato com o agente sanitizante durante 168 horas, de acordo com a Norma American Society for Testing and Materials (ASTM), D 543 – 06, através da exposição estática na concentração de 0,2% à temperatura ambiente. A cada 24 horas de exposição ao agente sanitizante as membranas eram enxaguadas (passagem de água através da membrana por filtração e alimentação por bomba de deslocamento positivo) com água destilada e em seguida foi realizado o teste de integridade de “ponto de bolha”, de acordo com a Norma American Society for Testing and Materials (ASTM) 316-03 para verificar se houve ataque químico, ou seja, danificação do poro da membrana. Os testes foram realizados em duplicata.

4.2.1.3 Teste de integridade ponto de bolha

O teste foi realizado manualmente pela alimentação de gás no sistema (ar comprimido filtrado) no lado superior da membrana (**Figura 7**). A pressão era vagarosamente aumentada, na proporção de 2 psi/ seg, e, assim que se observava o início do borbulhamento constante na saída do filtro (visualização através de uma mangueira conectada na saída do sistema e imersa em um béquer com água) parava-se a pressurização e registrava-se a pressão para comparação com o valor especificado pelo fabricante. Para considerar uma membrana como íntegra, é necessário que o valor registrado no manômetro, quando há borbulhamento constante, atinja valor acima do estabelecido pelo fabricante (PDA, 1998). Os testes foram realizados em duplicata.

De acordo com o fabricante, a pressão do ponto de bolha para membranas de poliamida BevASSURE II e polietersulfona BevASSURE PES é ≥ 24 psi.

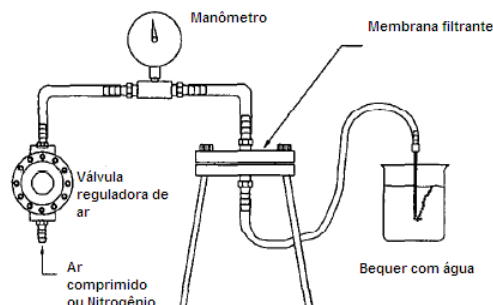


Figura 7: Esquema de montagem dos equipamentos para o teste de integridade.

Fonte: PDA Journal of pharmaceutical Science and technology, 1998.

4.3 Avaliação da adesão e formação de biofilmes em membranas

4.3.1 Obtenção do inóculo

A solução de desafio de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foi preparada a partir de água mineral sem gás previamente esterilizada à 121°C por 15 minutos em autoclave.

A água mineral utilizada para os testes foi “Água Mineral Natural Prata” adquirida em comércio de Sorocaba. Na embalagem das amostras consta a seguinte classificação: Água mineral, fluoretada, radioativa na fonte; também consta os valores das seguintes características físico-químicas: pH a 25°C de 6,29; temperatura da água na fonte de 22,6°C; condutividade elétrica a 25°C de 100,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$; resíduo de evaporação a 180°C de 65,85 mg/L; radioatividade na fonte a 20°C e 760 mm de Hg de 24,72 maches. Na **Tabela 3** abaixo, segue a composição química da água em mg/L. Estes dados estão presentes na embalagem da amostra.

Tabela 3: Composição química da água mineral utilizada nos testes em mg/L.

Elemento químico	Concentração em mg/L
Bicarbonato	44,26
Sulfato	3,60
Fluoreto	0,21
Sódio	2,24
Potássio	2,80
Magnésio	4,09
Cálcio	7,19
Cloreto	0,81
Nitrato	1,40

Fonte: Embalagem da água mineral “Água Mineral Natural Prata” de 1,5 Litros.

O inóculo foi preparado a partir de cepas (*Escherichia coli* ATCC 11229 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502) previamente liofilizadas e congeladas à -70°C.

As células foram ressuspensas através da remoção de uma perola da ampola com uma alça e em seguida rotacionada sobre a superfície do meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar). As placas foram incubadas à 35°C para *E. coli* e 37°C para *Pseudomonas aeruginosa* durante 24 horas. Em seguida, as células de *E. coli* da superfície do meio foram ressuspensas em 100 mL de caldo TSB e incubadas à temperatura de 35°C por 24 horas. Após a incubação, as células foram visualizadas no microscópio para confirmação das características das cepas. No preparo do inóculo, foi adicionado 1 mL de cultura de *E.coli* em um 1 litro de água peptonada a 1%. Esta suspensão permaneceu por 24 h à 35°C.

Para *Pseudomonas aeruginosa*, as células foram ressuspensas em 9 mL de solução tampão fosfato. Em seguida foi pipetado 1 mL em 1 litro de água peptonada a 1%. Esta suspensão permaneceu por 24 horas à 35°C.

Estes procedimentos produziram culturas com concentração de aproximadamente 10⁷ UFC/mL de ambos microrganismos. Para preparar uma solução desafio com 10⁴ UFC/mL, foi pipetado 1 mL das soluções de água peptonada em 1 litro de água mineral estéril.

A **Figura 8** ilustra as etapas realizadas para a preparação das culturas. Foram realizados testes para determinar o tamanho e o número de células/mL para todas as soluções de *E. coli* e *P. aeruginosa* (STANDARD METHODS 9215, 2004). Foi pipetada

uma amostra da cultura em uma lâmina de vidro para coloração de Gram de ambos microrganismos.

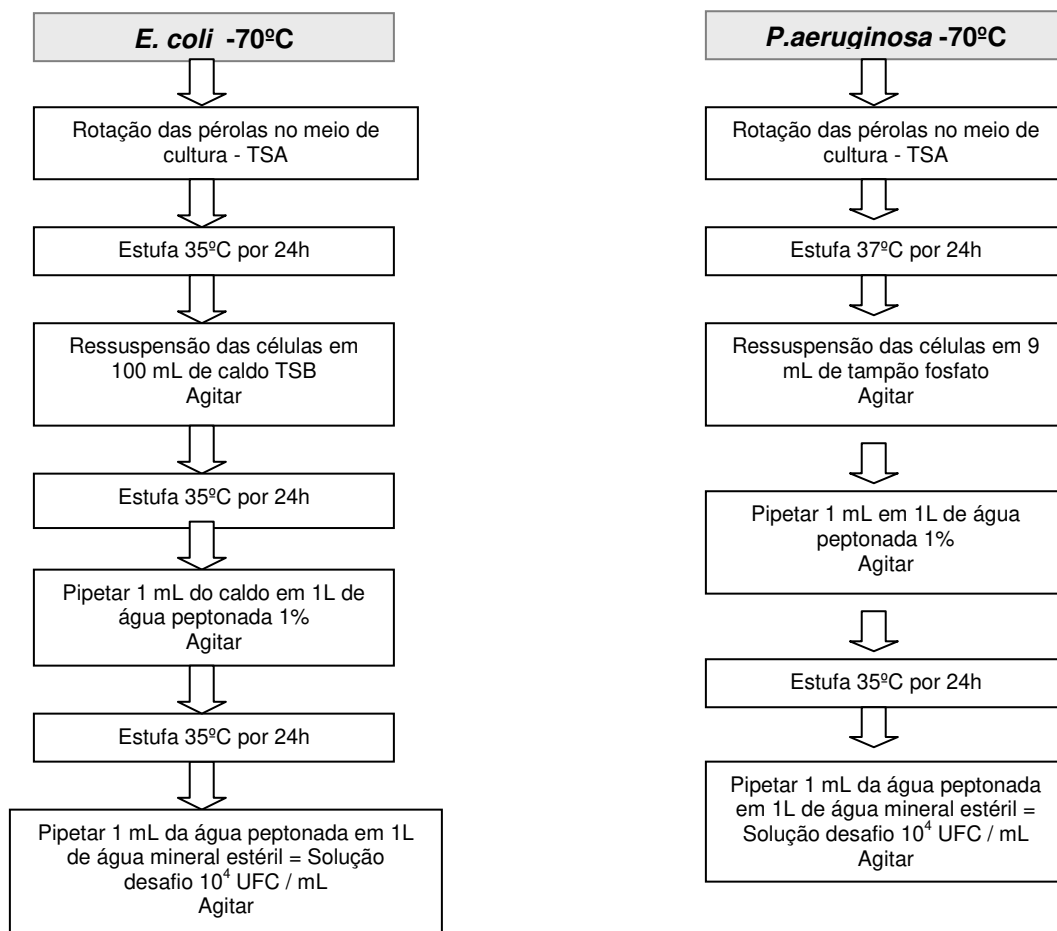


Figura 8: Etapas para a obtenção da cultura de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4.3.2 – Técnica de coloração de Gram

Para realização desta técnica, cada cultura de bactéria do meio TSA foi espalhada em uma lâmina (esfregaço) e seguida foi fixada com calor. A técnica se inicia com a coloração violeta de cristal por 60 segundos com posterior lavagem. Em seguida o esfregaço é submetido ao lugol por também 60 segundos e lavagem. Para descorar utiliza-se álcool acetona durante 20 segundos e posterior lavagem. A última coloração é com safranina por 20 segundos e lavagem com água. Após esta última etapa a lâmina é seca e levada ao microscópio para observação. Os resultados são para Gram (+) com coloração roxo e Gram (-) com rosa.

4.3.3 – Contato das células bacterianas com as membranas

Foram utilizadas 12 membranas de 47 mm de para material polimérico. As membranas de polietersulfona e poliamida foram cortadas em cupons de 1 cm x 1 cm. Foram gerados 60 cupons de polietersulfona e 60 cupons de poliamida para a realização dos testes com a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Em três frascos de aproximadamente 250 mL, contendo cada um 9 cupons de membrana de poliamida e em outros três frascos com 9 cupons de membrana de polietersulfona foram introduzidos 100 mL de suspensão do inóculo de cada microrganismo contendo aproximadamente 10^4 UFC/mL. A formação de biofilmes foi avaliada por incubação às temperaturas de 5°, 25° e 35°C e tempos de contato de 0, 24, 48 e 72 horas, pela quantificação das unidades formadoras de colônias/cm². A cada tempo e temperatura de contato três cupons foram retirados do inóculo para contagem padrão em placa. Os cupons do tempo zero serão aqueles que não foram imersos no inóculo, para controle da adesão. Todos os testes foram realizados em triplicata.

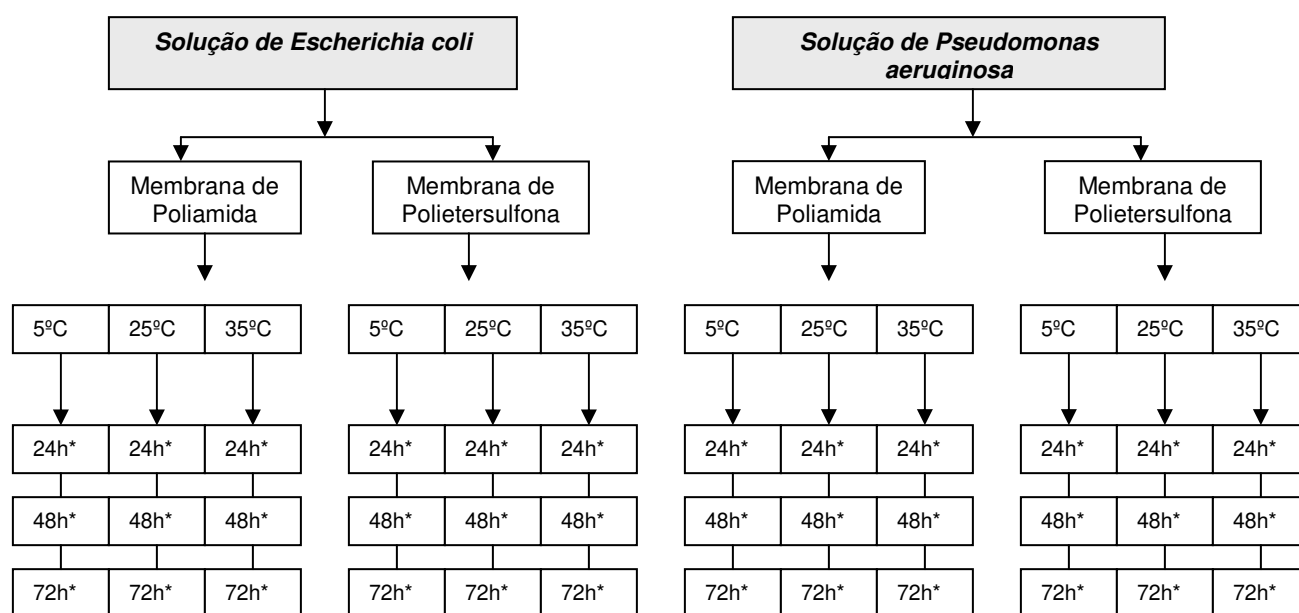
As temperaturas utilizadas foram definidas em função da faixa de temperatura geralmente encontrada em processos de água mineral, considerando 5°C, caso o elemento filtrante seja estocado em câmara fria, 25°C considerada como temperatura ambiente e 35° como ambiente em locais de clima mais quente. Os tempos de contato foram definidos em função do tempo de processo em que após um procedimento de filtração em uma planta de água mineral, a membrana ficaria sem utilização (sem realizar a filtração da água) por até 48 horas, até o início de uma nova filtração no dia seguinte, sem o processo de sanitização.

A relação entre temperatura e tempo de contado foi avaliada de acordo com um modelo para otimização dos experimentos, delineamento experimental fatorial, conforme **Tabela 4**, que identifica a importância de quão a temperatura afetará no tempo de contato para adesão do biofilme.

Tabela 4: Delineamento experimental para avaliação da formação de biofilmes por *E. coli* e *P. aeruginosa* em membranas poliméricas.

Temperatura (°C)	Tempo (horas)		
	24	48	72
5	5°C x 24h	5°C x 48h	5°C x 72h
25	25°C x 24h	25°C x 48h	25°C x 72h
35	35°C x 24h	35°C x 48h	35°C x 72h

A figura abaixo mostra todas as etapas que foram realizadas para mensurar a formação de biofilme nas membranas poliméricas.



* Triplicata

Figura 9: Fluxograma das etapas realizadas para a formação de biofilme.

4.3.4 – Quantificação das células do biofilme formado nas membranas

Cada cupom retirado do inoculo foi transferido para 10 mL de solução de água peptonada 0,1% por um minuto, sem agitação para a eliminação de células não planctônicas. Em seguida, foi imerso em 5 mL da mesma solução e submetidos a vórtex por 2 minutos para remoção das células sésseis. Em seguida foram realizadas diluições

para plaqueamento por profundidade em meio Trypic Soy Agar, seguido de incubação a 35°C por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado nos cupons sem a adição do inóculo no meio para controle.

4.3.5 – Análise estatística dos resultados

Os resultados do log UFC/cm² das bactérias aderidas nas membranas foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa Minitab 14. A análise realizada foi ANOVA.

4.3.6 – Teste para verificação do entupimento das membranas

Para cada microrganismo utilizou-se 4 membranas de 47 mm de diâmetro de poliamida e 4 membranas de polietersulfona. Foram utilizadas soluções de desafio da cultura de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (10⁴ UFC/mL).

As membranas foram imersas nas soluções para os tempos de contato de 24h e 72h e temperatura de 35°C. Em cada tempo estabelecido foi retirada uma membrana de 47 mm de diâmetro para verificar o grau de entupimento das mesmas pela quantidade de bactérias aderidas. Foi realizado um fluxo dinâmico de água microfiltrada pelas membranas. A vazão de água para cada membrana está na **Tabela 5**. A água utilizada para este teste foi previamente filtrada em filtro absoluto de 5 µm e membrana de 0,2 µm. Os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 5: Valores de vazão de água em mL/min nas membranas para perda de carga inicial de 2 psi.

Membrana	Vazão de água em mL/min para perda de carga inicial de 2 psi
Polietersulfona	105
Poliamida	26

Fonte: 3M, catálogo dos elementos filtrantes.

4.3.7 Avaliação visual da adesão e formação de biofilmes por microscopia eletrônica

Para visualização da adesão e formação de biofilme bacteriano, uma membrana (47 mm de diâmetro) de cada teste foi incubado de acordo com os tempos e temperaturas pré definidos e imersos em tampão fosfato 0,1M para rinsagem do meio de cultura e células planctônicas. A fixação foi realizada utilizando-se glutaraldeído 2% em solução de tampão fosfato 0,2M, com imersão das membranas por 3 horas e posterior lavagem durante 5 minutos em solução tampão fosfato 0,2M. Em seguida as membranas foram mergulhadas em tetróxido de ósmio 2% durante 1 hora na geladeira e posterior lavagem com água destilada. Para desidratação utilizou-se álcool etílico PA em ordem crescente das concentrações de 30, 50, 70, 80, 95%, por 10 minutos de contato em cada concentração, e 100% em três repetições por 10 minutos cada, para retirada completa da água. As membranas foram cortadas em cupons de 1 cm² e em seguida foram transferidos para cestas permeáveis e colocados no Secador de Ponto Crítico ("Critical Point Dryer") Balzers CPD 030, com utilização de gás carbônico para retirada completa do álcool utilizado na etapa de desidratação. Após a secagem, os cupons foram levados ao Metalizador Balzers Sputter Coater SCD 050, e submetidos ao processo de metalização com fina camada de ouro por 180 segundos, com a finalidade de torná-los bons condutores elétricos, de forma a melhorar sua visualização. A superfície dos cupons foi observada no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM – 5800 LV, em vários aumentos que poderiam variar de 800 a 8000 vezes (ROSADO, 2009).

Para verificação da topografia da superfície, o procedimento de preparo das amostras teve início na etapa de metalização.

4.4 Avaliação da eficiência de sanitizantes

Para cada concentração de sanitizante e tempo de contato foram utilizados 10 cupons de 1cm² de cada material da membrana. Os testes foram realizados com a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os cupons das membranas foram imersos, assepticamente, em recipientes de vidro, contendo 100 mL da suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* para uma contagem final de 1x10⁴ UFC/mL, e incubados a 35 ± 1 °C/ 24 ± 1h. Cada recipiente recebeu 10 cupons para análise e 1 para controle, num total de 10 ensaios para cada sanitizante. O cupom de controle refere-se aquele que não recebeu o sanitizante, e sua contagem foi utilizada para calcular o número de reduções decimais promovido pelos sanitizantes. Após este processo os cupons foram rinsados em água peptonada 0,1% para retirada de meio e células

planctônicas e imersos em 10 mL de cada solução sanitizante de divosan forte 0,1%, 0,2% na temperatura de 25°C e água à 85°C nos tempos de contato de 10 e 20 minutos. Após o tempo de contato os cupons foram transferidos para 10 mL de solução neutralizante de tiosulfato de sódio a 1% por 10 minutos, para inativação da ação do sanitizante químico. Os cupons foram retirados da solução neutralizante, imersos em 5 mL de solução peptonada 0,1% e submetidos a vórtex por dois minutos para remoção das células sésseis. Foram preparadas as diluições e plaqueamento por profundidade TSA, seguido de incubação a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 1\text{h}$ (ROSADO, 2009).

5 Resultados e Discussão

5.1 Avaliação da compatibilidade das membranas com solução de ácido peracético à 0,2%

Os testes de compatibilidade foram realizados de acordo com as etapas do procedimento anteriormente descrito. Primeiramente foi determinado o volume de enxágüe das membranas após o contato com a solução sanitizante durante 168h. Os resultados encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6: Volume de água para enxágüe das membranas

Amostra	Volume de água após enxágüe (mL)	pH da água após enxágüe	Volume de água após enxágüe (mL)	pH da água após enxágüe
Poliamida - A	50	5,5	150	7,2
Poliamida - B	50	5,6	150	7,0
Polietersulfona - A	50	5,5	150	7,0
Polietersulfona - B	50	5,4	150	7,1

De acordo com a tabela acima, o volume de água adotada para o enxágüe das membranas após o contato com a solução sanitizante na concentração de 0,2% foi de 150 mL.

O teste de compatibilidade foi realizado de acordo com a Norma ASTM D542-06 para verificar a integridade das membranas.

Foi observado que as membranas após 168 horas de contato com a solução sanitizante tiveram o valor do ponto de bolha semelhante ao valor inicial, antes do contato com a solução sanitizante. Foram consideradas integras após o teste, e, portanto compatíveis com a solução a ser utilizada.

Tabela 7: Teste de integridade nas membranas após contato com solução sanitizante

Membrana	Especificação	Mínimo Ponto de Bolha inicial – antes do contato (psi)	Ponto de Bolha após 168h de contato (psi)
Poliamida 0,45 µm – A	≥24 psi	26	27
Poliamida 0,45 µm – B		27	27
Polietersulfona 0,45 µm - A		55	55
Polietersulfona 0,45 µm - B		57	56

5.2 Estudo da formação de biofilme microbiano em membranas de filtração de água mineral

5.2.1 Obtenção do inóculo

De acordo com Encyclopedia of Public Health, 2002, a *Escherichia coli* apresenta-se como bastonetes gram negativos de 1,0 à 1,5 µm de largura e 2,0 à 6,0 µm de comprimento.

A *Pseudomonas aeruginosa* é caracterizada por bacilos gram negativos retos ou ligeiramente curtos com 0,5 à 1,0 µm de largura e 1,0 à 5,0 µm de comprimento (JORNAL INFORMATIVO CEFAR, 2009).

As bactérias da cultura de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram observadas no microscópio óptico apresentaram-se como gram negativas, com coloração rosa, e com tamanho de acordo com a literatura.

As características de tamanho dimensional das bactérias justificam a utilização de membranas com porosidade de 0,45 µm. Esta porosidade interceptará mecanicamente as bactérias da solução de desafio para posterior análise.

5.2.2 Desenvolvimento da população microbiana ao longo da formação dos biofilmes

5.2.2.1 *Escherichia coli*

Na **Tabela 8** abaixo observa-se que o número de células de *Escherichia coli* aderidas às superfícies das membranas quando expostas à temperatura de 5°C foi maior

nas primeiras 24 horas de contato, ou seja, a temperatura de 5°C praticamente estabilizou o crescimento da população deste microrganismo nas membranas. A quantidade de bactérias aderidas na membrana de poliamida não variou entre 24h e 72h de contato.

Tabela 8: População de *E. coli* (UFC/cm²) aderidas aos cupons de membranas filtrantes.

Temperatura (°C)	Tempo (horas)	UFC/cm ² ± DP *	UFC/cm ² ± DP *
		Poliamida	Polietersulfona
25	Zero - controle	0 ± 0,17	0 ± 0,17
	24h	3,40 ± 0,49	4,00 ± 0,35
	48h	3,60 ± 0,16	3,50 ± 0,37
	72h	3,48 ± 0,26	2,91 ± 0,17
25	24h	5,0 ± 0,24	5,17 ± 0,24
	48h	5,6 ± 0,10	5,52 ± 0,11
	72h	5,88 ± 0,13	5,99 ± 0,06
35	24h	5,34 ± 0,26	5,48 ± 0,15
	48h	6,37 ± 0,15	5,98 ± 0,39
	72h	6,21 ± 0,15	6,26 ± 0,13

*Média de três amostras

DP: Desvio padrão

Analisando o crescimento bacteriano na temperatura de 25°C, como mostra a **Tabela 8**, observa-se um aumento de células aderidas na membrana de poliamida de 5 ciclos log para 5,88 após 72h e na membrana de polietersulfona este aumento foi de 5,17 ciclos log para 5,99. O aumento médio na população de bactérias aderidas para as duas membranas após 72h de contato foi de aproximadamente 0,8 ciclos log em relação ao tempo de contato inicial adotado (24h).

Para a temperatura de 35°C, a população de bactérias aderidas nas duas membranas após 72h teve um crescimento médio de 0,93 ciclos log em relação às primeiras 24 horas de contato. Nota-se que a população de bactérias após 24h de contato foi maior em comparação às temperaturas de 5°C e 25°C. O fato de haver um número maior de bactérias logo nas primeiras 24h de contato é devido à proximidade da temperatura ótima de crescimento desta bactéria, 35°C (Encyclopedia of Public Health, 2002).

Na **Figura 10**, encontra-se o gráfico da população de *E. coli* presentes nas solução de desafio (água mineral) para as temperaturas de 5°C, 25°C e 35°C nos tempos: inicial, momento de preparação da solução de desafio e após todos os tempos de incubação de 24h, 48h e 72h.

Na temperatura de 5°C a população de bactérias aumentou 1 ciclo log após 24h, de 4,47 para 5,47 ciclos log. Após 72h este valor reduziu 3,47 ciclos log.

Nas temperaturas de 25 e 35°C a concentração aumentou para > 6 ciclos log em relação ao valor inicial, mostrando o favorecimento do aumento de temperatura ao crescimento destes microrganismos.

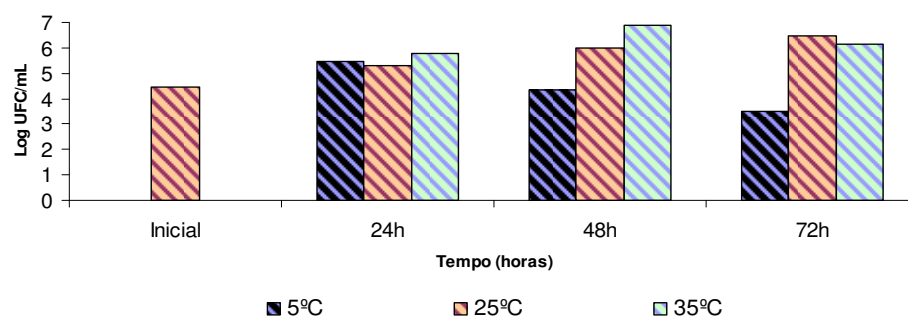


Figura 10: Representação comparativa da população (log UFC/mL) de *E. coli* em suspensões de água mineral incubadas a 24, 48 e 72 horas e temperaturas de 5°, 25° e 35°C.

De acordo com Brenner, Krieg e Stanley (2005), a *Escherichia coli* tem habilidade de crescer em temperatura que variam de 15 a 45°C, faixas ótimas de crescimento se estendendo de 21 á 37°C.

5.2.2.1.1 Análise de variância dos resultados de aderência com *E. coli*

Os resultados indicam que estão no apêndice A, mostram que o modelo adotado para a realização dos testes (delineamento experimental fatorial) foi significativo, pois o $p < 0,05$. Como os dados de F calculado respectivamente para as membranas de poliamida e polietersulfona (29,61 e 25,25) foram maiores que o F tabelado (5,14), rejeita-se a hipótese nula, isto é, se aceita o modelo como adequado.

Abaixo seguem os gráficos Boxplot com os dados da contagem (log UFC/cm²) de bactérias aderidas nas membranas de poliamida e polietersulfona nas respectivas temperaturas e tempos de contato do teste. Na **Figura 11** evidencia-se fortemente o aumento de células aderidas com o aumento da temperatura, mostrando que o maior número de células aderidas à membrana de poliamida (> 5,8 log UFC/cm²) para a maior temperatura (35°C) de incubação.

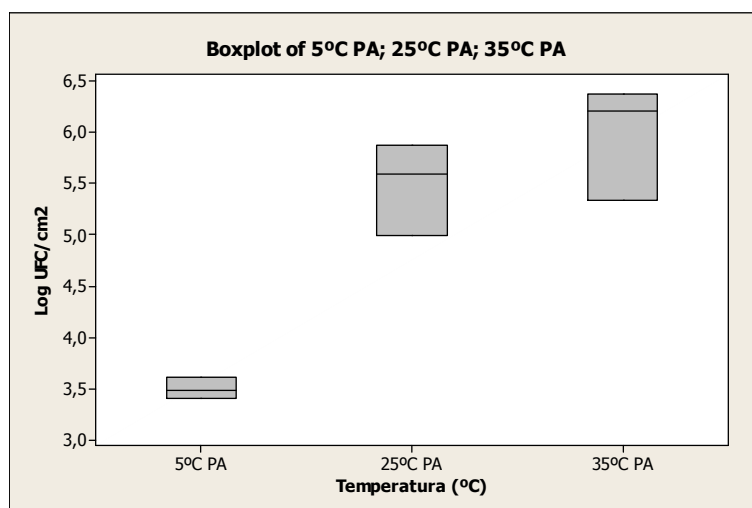


Figura 11: Gráfico Boxplot da contagem (log UFC/cm²) de *Escherichia coli* aderidos às membranas de poliamida nas temperaturas de 5°C, 25°C e 35°C.

Para a membrana de polietersulfona, na **Figura 12**, o aumento do número de células também foi evidenciado com o aumento da temperatura, atingindo valores superiores a 6 ciclos log UFC/cm² para 35°C.

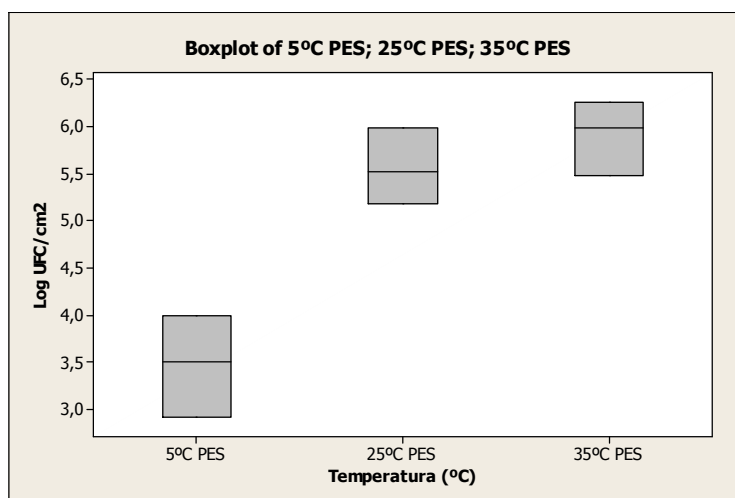


Figura 12: Gráfico Boxplot da contagem (log UFC/cm²) de *Escherichia coli* aderidos às membranas de polietersulfona nas temperaturas de 5°C, 25°C e 35°C.

5.2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Para *Pseudomonas aeruginosa*, considerado um microrganismo psicotrófico, observa-se um leve decréscimo na população de células aderidas às membranas na temperatura de 5°C. Na **Tabela 9** abaixo, observa-se que o número de células de *Pseudomonas aeruginosa* aderida nas membranas à temperatura de 5°C foi maior para as primeiras 24 horas de contato, ou seja, a temperatura de 5°C praticamente estabilizou o crescimento da população deste microrganismo nas membranas.

Tabela 9: População de *Pseudomonas aeruginosa* (UFC/cm²) aderidas aos cupons de membranas filtrantes

Temperatura (°C)	Tempo (horas)	UFC/cm ² * ± DP *	UFC/cm ² * ± DP *
		Poliamida	Polietersulfona
25	Zero - controle	0 ± 0,28	0 ± 0,00
5	24h	3,49 ± 0,25	3,41 ± 0,75
	48h	2,80 ± 0,47	2,69 ± 0,06
	72h	2,55 ± 0,17	2,18 ± 0,25
25	24h	4,0 ± 0,24	4,24 ± 0,22
	48h	4,34 ± 0,08	4,24 ± 0,13
	72h	5,42 ± 0,06	6,25 ± 0,58
35	24h	4,25 ± 0,23	3,95 ± 0,25
	48h	4,38 ± 0,12	4,56 ± 0,10
	72h	5,81 ± 0,07	4,88 ± 0,22

*Média de três amostras

DP: Desvio padrão

Nos testes à 25°C, como mostra a **Tabela 9**, a população de microrganismos aumentou aproximadamente 1 ciclo log de 24h a 72h de contato, chegando a 5,42 ciclos log na membrana de poliamida e 6,25 ciclos log nas membranas de polietersulfona.

Observa-se que a população de bactérias também teve um significativo aumento após 72h de contato, ficando em aproximadamente com uma média de 5,3 ciclos log de bactérias aderidas por cm².

À temperatura de 35°C e após 72h de contato, o número de bactérias aderidas na membrana de poliamida teve aumento de 1,56 ciclos log e na membrana de polietersulfona de 0,93 ciclo log em relação ao tempo de 24h.

As soluções de desafio com *Pseudomonas aeruginosa* também tiveram um aumento considerado nas temperaturas de 25 e 35°C. A concentração inicial foi de 4,6 ciclos log UFC/mL, chegando até 6,42 ciclos log à 25°C e 6,56 à 35°C ciclos log após 72h de exposição em ambas as temperaturas.

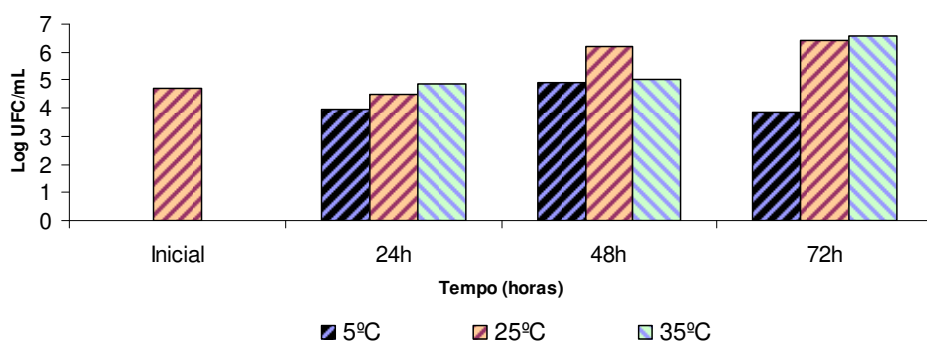


Figura 13: Representação comparativa da população (logUFC/mL) de *P.aeruginosa* em suspensões de água mineral incubadas a 24, 48 e 72 horas e temperaturas de 5°, 25° e 35°C.

A figura acima mostra que após 72h ainda há presença de um grande número de células de *Pseudomonas aeruginosa* na amostra de água mineral.

A permanência de células de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água mineral foi observado por Iwersel et al (2009), logo após 180 dias de estocagem das amostras. Foram observadas amostras onde a quantidade de microrganismos foi reduzida em relação ao número inicial e amostras em que aumentaram após 6 meses de estocagem.

Tamagnini e González (1997), observaram a predominância de *Pseudomonas aeruginosa* em relação a microbiota aeróbia em amostras de água mineral após 30 dias de estocagem.

Legnani, et AL (1999), durante 5 anos de estudo, observaram que amostras de água mineral com TDS de 72,5 mg/L e 382 mg/L e TOC de 0,17 mg/L e 0,35 mg/L e com aproximadamente 2 log UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentaram aumento na concentração do microrganismo em até 3 dias de armazenamento, mantendo a concentração média de aproximadamente 70 dias. Foi observado que após 70 dias a

população tinha redução para a água de menor TOC e após 100 dias para água com maior valor de TOC.

5.2.2.2.1 Análise de variância dos resultados de aderência com *Pseudomonas aeruginosa*

Os valores das análises de variância apresentadas no apêndice B indicaram que o modelo adotado para a realização dos testes (delineamento experimental fatorial) foi significativo, pois o $p < 0,05$. Como os dados de F calculado respectivamente para as membranas de poliamida e polietersulfona (6,07 e 5,95) foram maiores que o F tabelado (5,14), rejeita-se a hipótese nula, isto é, se aceita o modelo como adequado.

Abaixo seguem os gráficos Boxplot com os dados da contagem ($\log \text{UFC}/\text{cm}^2$) de bactérias aderidas nas membranas de poliamida e polietersulfona nas respectivas temperaturas e tempos de contato do teste. A **Figura 14** evidencia fortemente o aumento da população de células aderidas com o aumento da temperatura, aonde o número de células aderidas à membrana de poliamida atinge valores > 5 ciclos $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ para a maior temperatura (35°C).

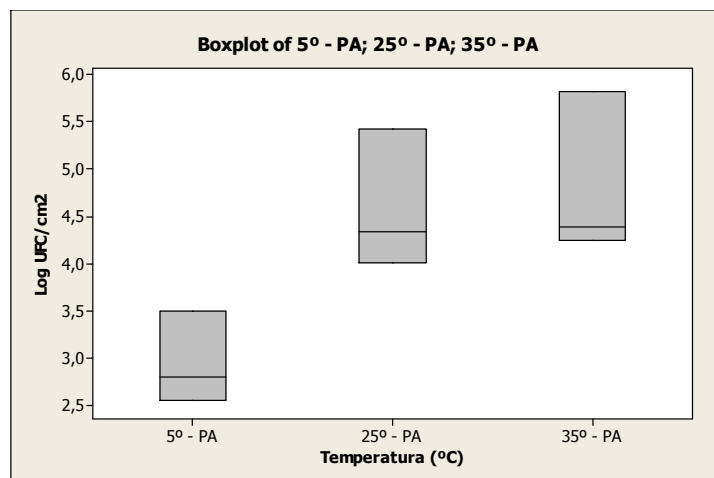


Figura 14: Gráfico Boxplot da contagem ($\log \text{UFC}/\text{cm}^2$) de *Pseudomonas aeruginosa* aderidos às membranas de poliamida nas temperaturas de 5°C , 25°C e 35°C .

Para a membrana de polietersulfona, na **Figura 15**, o aumento do número de células também foi evidenciado, porém o maior aumento aconteceu na temperatura de 25°C , sendo aproximadamente $> 6 \log \text{UFC}/\text{cm}^2$.

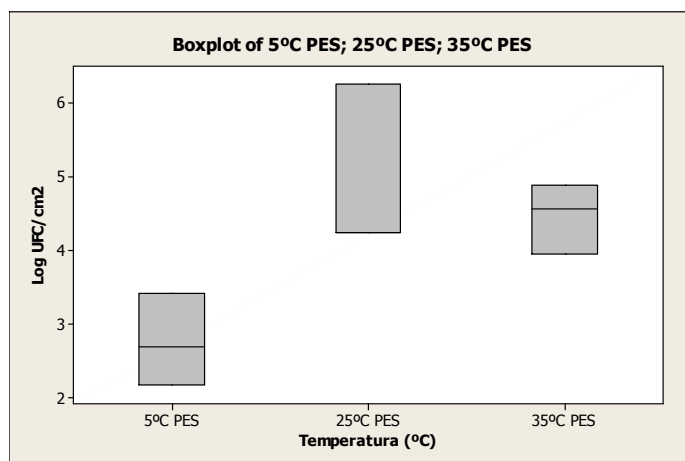


Figura 15: Gráfico Boxplot da contagem (Log UFC/cm²) de *Pseudomonas aeruginosa* aderidos às membranas de polietersulfona nas temperaturas de 5°C, 25°C e 35°C.

5.4 Teste para verificação do entupimento das membranas

Os testes realizados com as membranas após o contato durante 24h e 72h com solução de *Escherichia coli* à 35°C não mostraram o entupimento dos poros da membrana, porém houve um aumento no diferencial de pressão das mesmas somente após 72 horas de contato, estando em aproximadamente 5,5 psi para a poliamida e 5,0 psi para a polietersulfona. Estes dados estão evidenciados na **Tabela 10** abaixo.

Tabela 10: Diferencial de pressão das membranas após contato com suspensão ^a de *E. coli* durante 24h e 72h de contato à 35°C.

Condição (horas)	*Membrana PA (13 cm ²) Vazão de 30 mL/min		*Membrana PES (13 cm ²) Vazão de 100 mL/min
	Tempo (min)		Diferencial de pressão (psi)
24	0	1,5	1,3
	5	2,0	2,0
	10	2,0	2,0
72	0	1,5	1,5
	5	5,0	4,8
	10	5,5	5,0

^a suspensão a 6×10^4 UFC/mL

*Os resultados representam a média de duas repetições.

Os testes realizados com as membranas após o contato durante 24h e 72h com solução de *Pseudomonas aeruginosa* à 35°C não mostraram o entupimento dos poros da membrana, porém houve um aumento no diferencial de pressão das mesmas somente após 72 horas de contato, estando em aproximadamente 5,7 psi para a poliamida e 5,0 psi para a polietersulfona. Estes dados estão evidenciados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Diferencial de pressão das membranas após contato com suspensão^a de *Pseudomonas aeruginosa* durante 24h e 72h de contato à 35°C.

Condição (horas)	*Membrana PA (13 cm ²) Vazão de 30 mL/min		*Membrana PES (13 cm ²) Vazão de 100 mL/min
	Tempo (min)	Diferencial de pressão (psi)	
24	0	1,3	1,4
	5	1,8	2,0
	10	1,9	2,0
72	0	1,5	1,4
	5	5,3	4,9
	10	5,7	5,0

^a suspensão de cultura a 6×10^4 UFC/mL

*Os resultados representam a média de duas repetições.

Os diferenciais de pressão observados nas membranas das tabelas acima não são significativos para considerar o entupimento da membrana. Segundo Habert et al, (2006), o mecanismo de gradiente utilizado para a microfiltração é a força motriz de pressão, que varia de 0,5 à 3 atm (ou 44 psi). Para o entupimento dos poros, à vazão constante, considera-se que o diferencial de pressão deve estar em aproximadamente 35 psi.

5.5 Avaliação visual da formação de biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

A microscopia de varredura foi realizada nas membranas sem o contato com a cultura de bactérias, chamada de branco e nas membranas em contato com as bactérias em análise nos tempos de 24h e 72h de contato na temperatura de 35°C, condições estas que proporcionaram o maior crescimento da população microbiana.

5.5.1 Análise da formação de biofilmes por *Escherichia coli*

A análise das membranas submetidas à microscopia eletrônica evidenciou que o aumento do tempo de contato, dependendo da temperatura de incubação, promoveu um aumento da população de bactérias na superfície das membranas.

As imagens das **Figuras 16 e 17** representam as membranas que não estiveram em contato (controle) com as suspensões de microrganismos.

A membrana de polietersulfona da **Figura 16** apresenta-se com poros maiores que 0,45 μm na superfície, característica esta devido a assimetria desta membrana, aonde o tamanho dos poros se reduz no sentido da superfície para o interior da mesma. São chamadas também de multi zonas onde há o aumento do fluxo de fluído e maiores volumes filtrados.

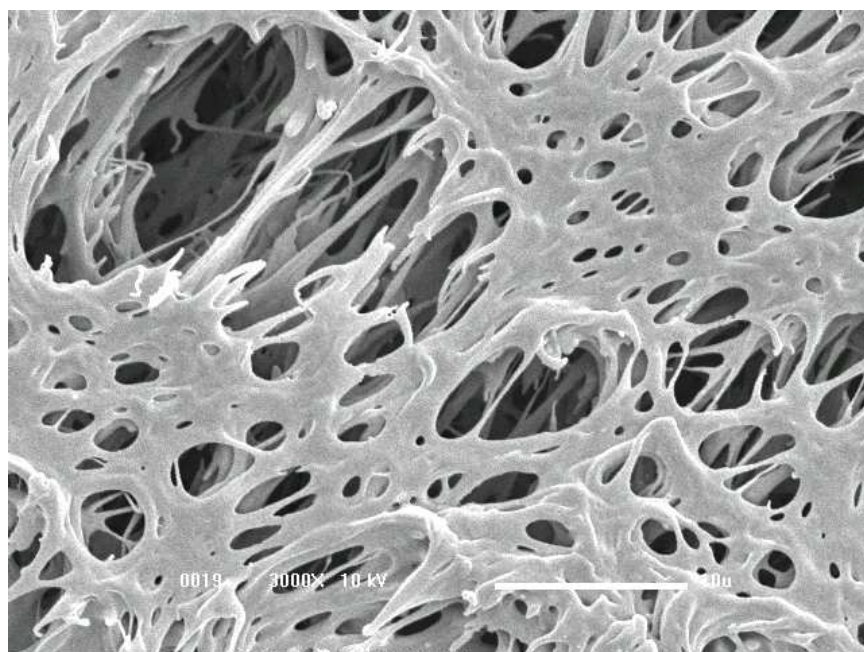


Figura 16: Membrana de polietersulfona (branco) com aumento de 3000x.

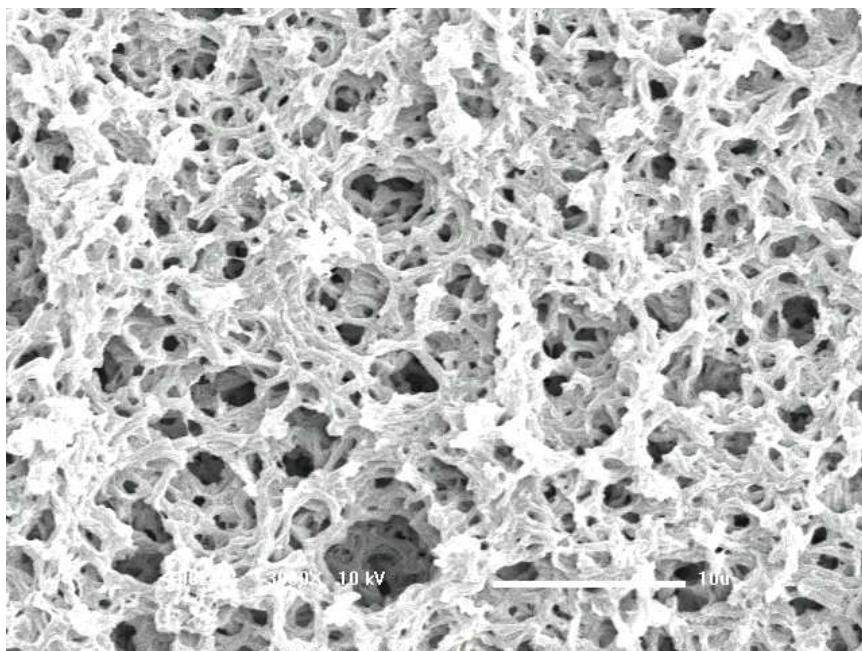


Figura 17: Membrana de poliamida (branco) com aumento de 3000x

Segundo Strathmann (1990), a maioria das membranas usadas em processos de separação em grande escala são estruturas assimétricas, nas quais as duas propriedades básicas requeridas para qualquer membrana, altas taxas de transporte de massa para certos componentes e boa resistência mecânica, são fisicamente separadas.

Estas membranas consistem de um número de camadas, cada uma com diferentes estruturas e permeabilidades. Uma típica membrana assimétrica tem uma densa relatividade. As propriedades de separação são determinadas pela camada superficial e a resistência para transferência de massa é determinada pela camada mais fina, com poros menores. (MEMBRANE TYPES, 2011).

Na **Figura 18** observa-se que há alguns pontos brancos, característicos de exopolissacarídeos, mas não foi evidenciado um grande número de células de *E. coli* na superfície da membrana.

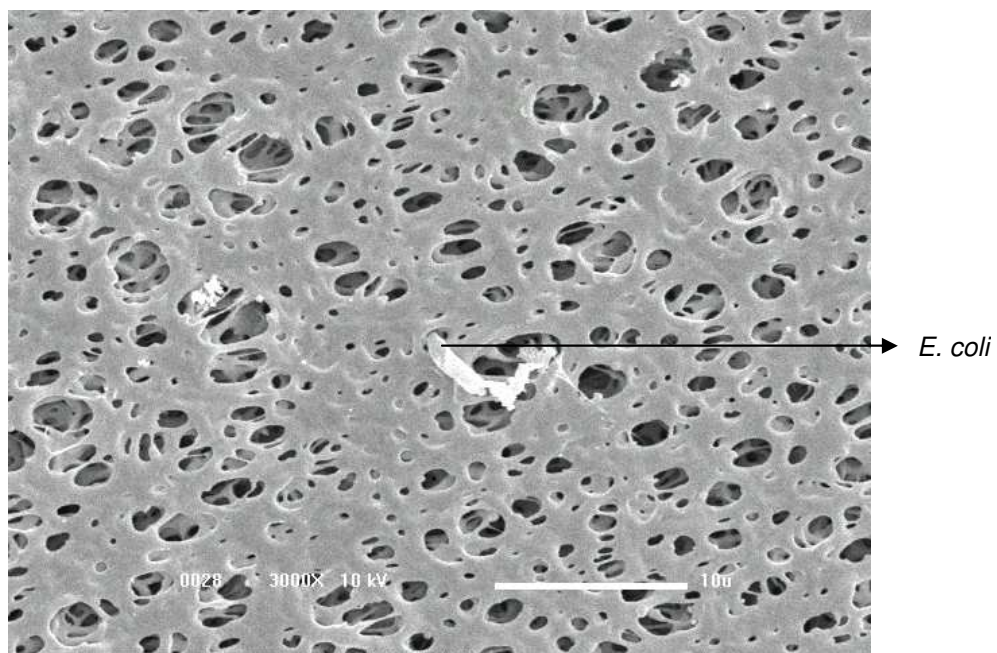


Figura 18: Membrana de polietersulfona *com Escherichia coli* (após 24h de contato) com aumento de 3000x.

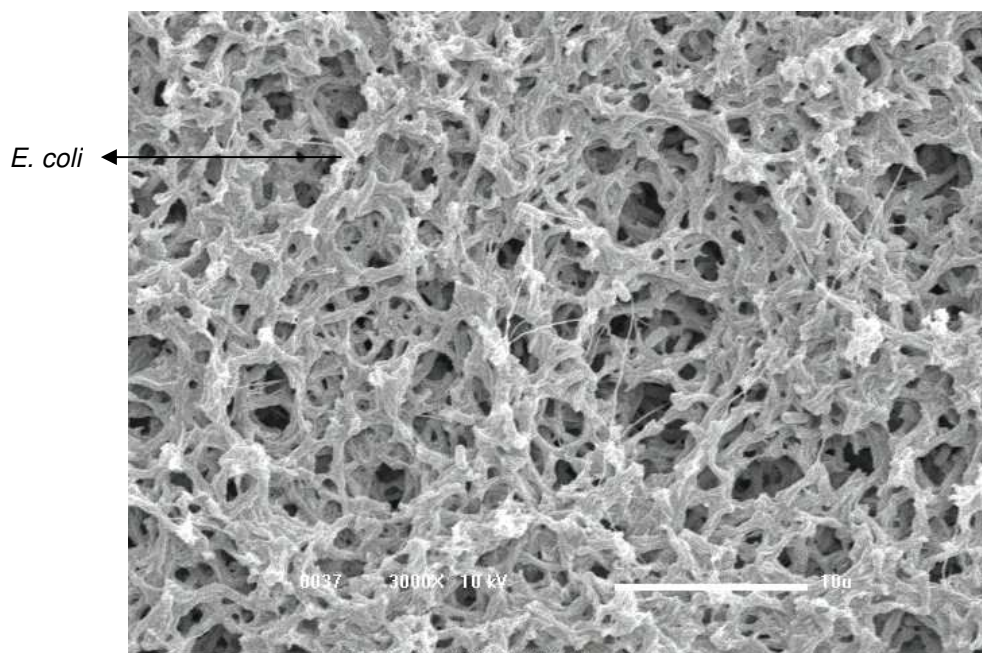


Figura 19: Membrana de poliamida *com Escherichia coli* (após 24h de contato) com aumento de 3000x.

Na **Figura 20** é mostrado que na superfície da membrana de poliamida há alguns microrganismos, mas não chega a bloquear os poros da membrana, como visto também no teste de entupimento das membranas.

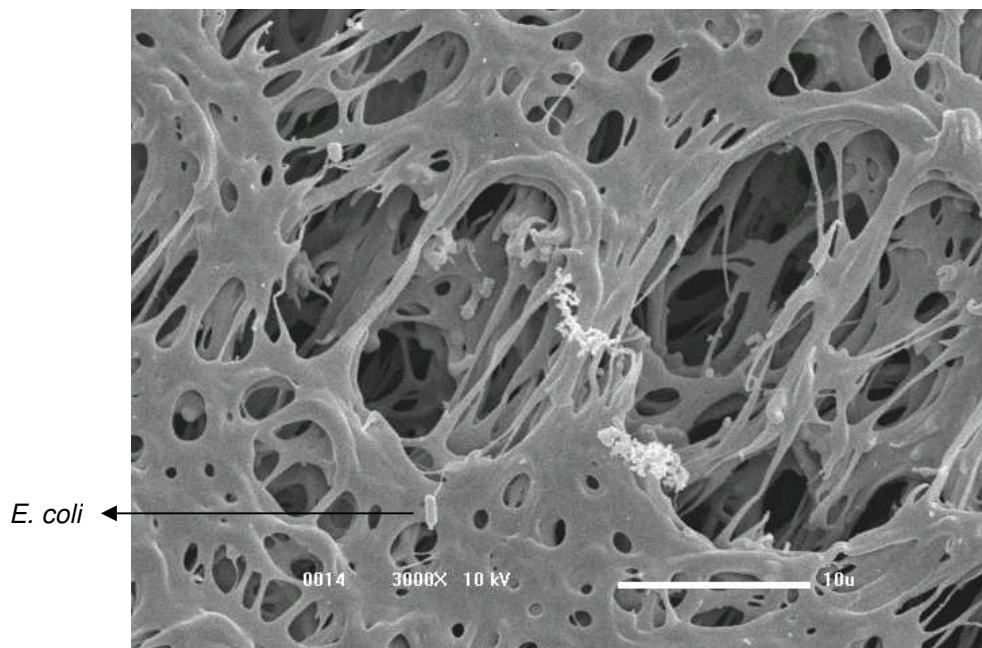


Figura 20: Membrana de polietersulfona com *Escherichia coli* (após 72h) com aumento de 3000x.

Os microrganismos da **Figura 20** estão evidenciados entre as camadas da membrana de polietersulfona, devido à característica de assimetria. No entanto esta figura mostra que há um número maior de microrganismos em relação ao tempo de contato de 24h.

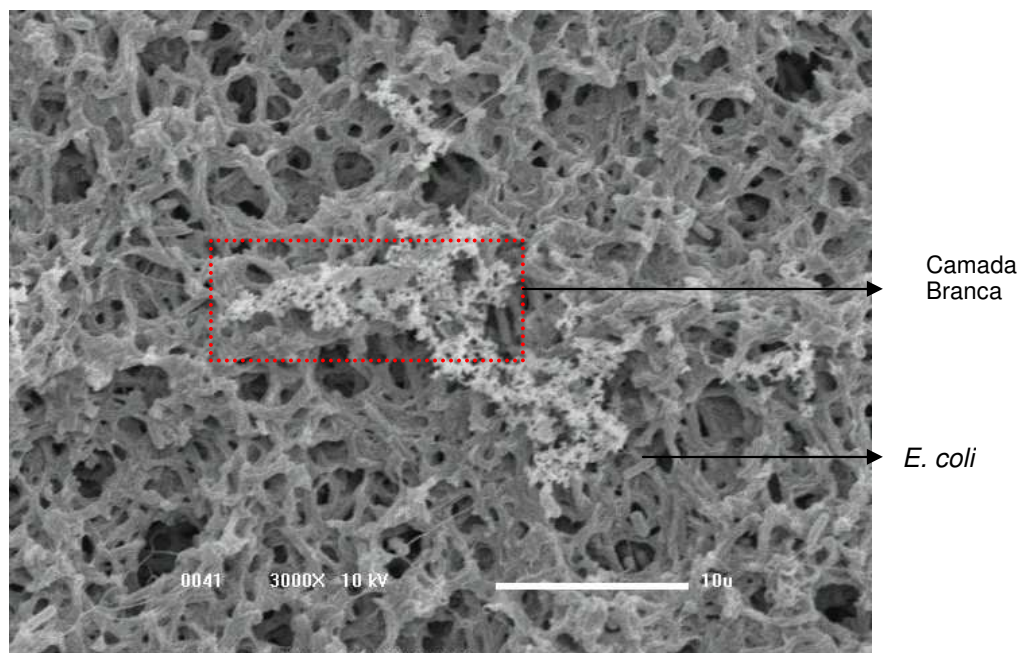


Figura 21: Membrana de poliamida com *Escherichia coli* (após 72h) com aumento de 3000x.

Na **Figura 21** observa-se que a membrana de poliamida (após 72h de contato com a solução de *Escherichia coli*) encontra-se com um número de microrganismos superior a membrana de poliamida após 24h de contato. Encontra-se também uma camada branca, Estes dados são evidenciados também na contagem dos microrganismos aderidos aos cupons por contagem padrão em placas de TSA (Tryptic Soy Agar).

5.5.2 Análise formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*

As membranas com contaminação de *Pseudomonas aeruginosa* tiveram praticamente a mesma característica das membranas com *Escherichia coli*. A quantidade de microrganismos foi aumentando de acordo com o tempo de contato com a solução de células microbianas.

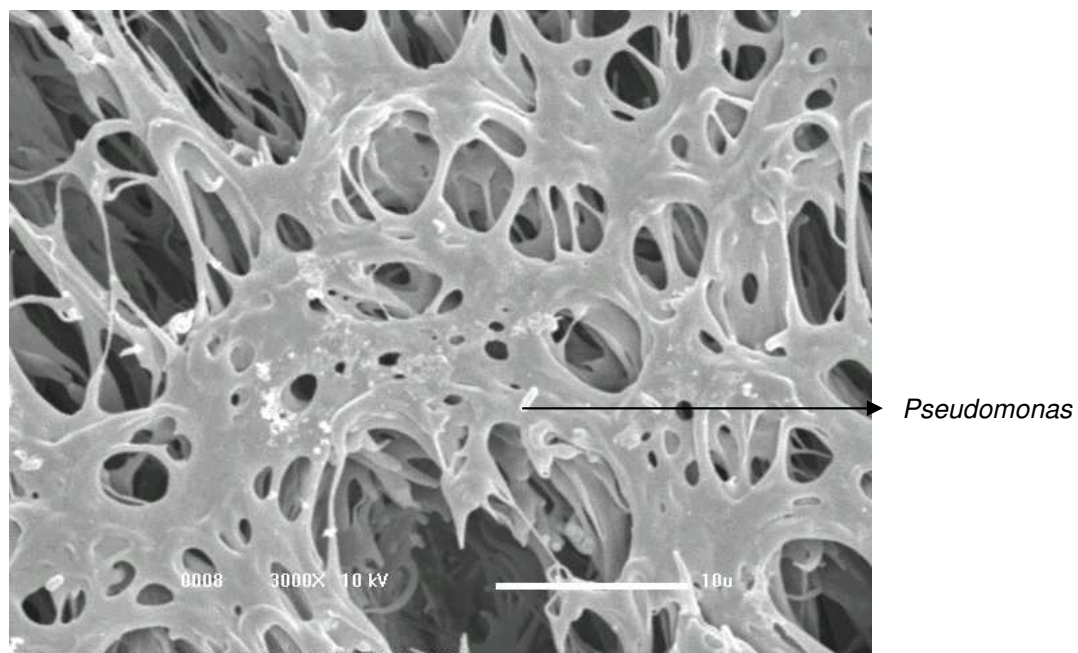


Figura 22: Membrana de polietersulfona com *Pseudomonas aeruginosa* (após 24h de contato) com aumento de 3000x.

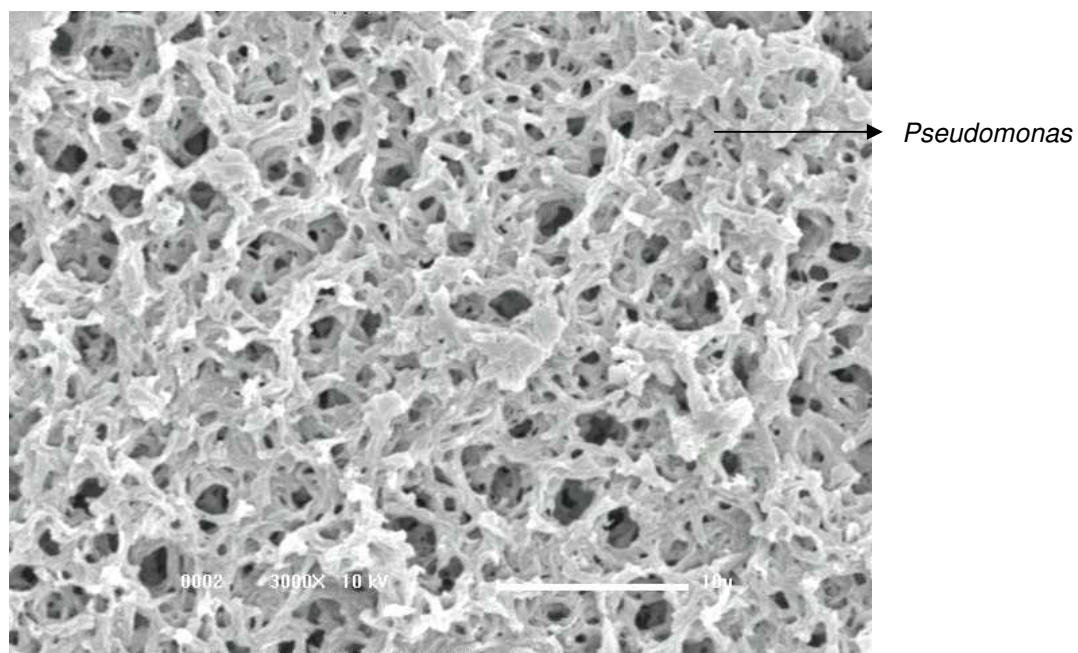


Figura 23: Membrana de poliamida com *Pseudomonas aeruginosa* (após 24h de contato) com aumento de 3000x.

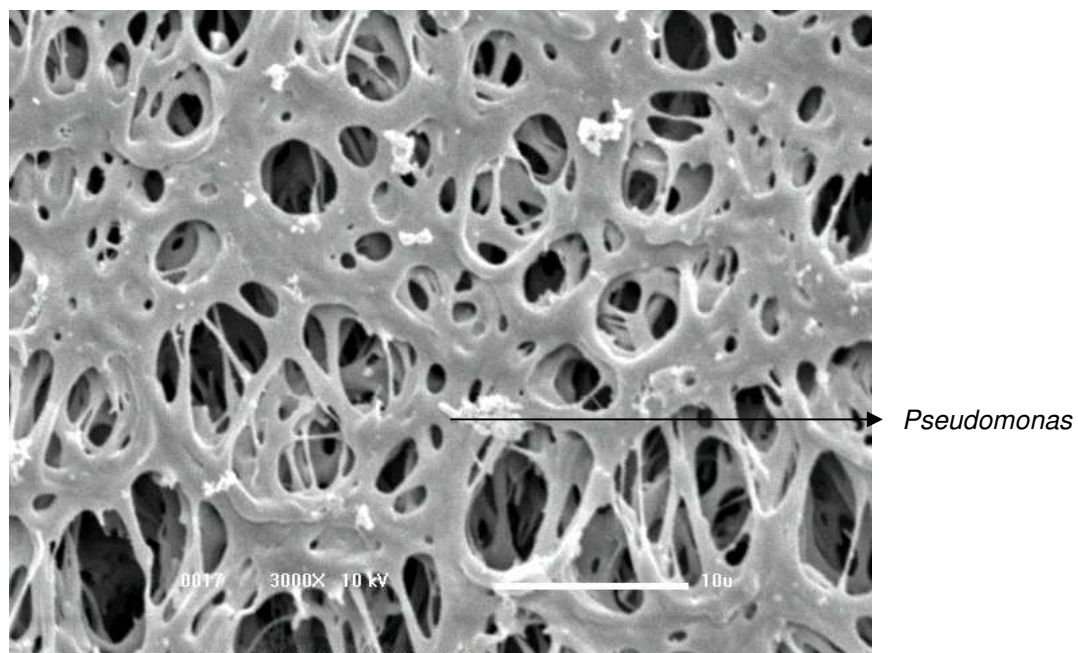


Figura 24: Membrana de polietersulfona com *Pseudomonas aeruginosa* (após 72h de contato) com aumento de 3000x.

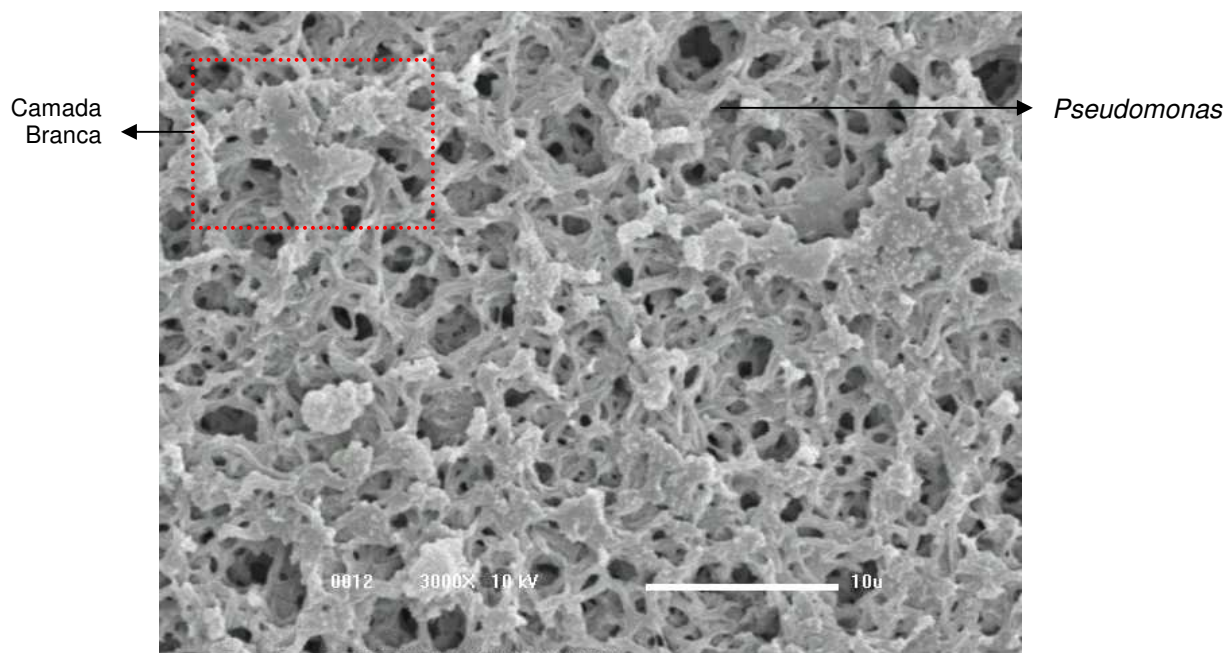


Figura 25: Membrana de poliamida com *Pseudomonas aeruginosa* (após 72h de contato) com aumento de 3000x.

A membrana de poliamida com *Pseudomonas aeruginosa*, após 72h de contato foi a membrana que visualmente obteve maior concentração de microrganismos na sua superfície.

5.6 Avaliação da eficiência de Sanitizantes

5.6.1 Sanitização das membranas filtrantes após contato com suspensão de *E. coli*

Os resultados da população de *E. coli* presente em cada cupom controle antes de serem submetidos a sanitização por agentes sanitizantes são apresentados na **Tabela 12**. A média da contagem nos cupons situou-se próxima de 4 Log UFC/cm², valor este que foi utilizado como referência para o cálculo dos valores de redução decimal da contagem por efeito dos diferentes processos de sanitização. Foram analisadas amostras em duplicata dos cupons após contato com a cultura de bactérias para determinar o número de log UFC/cm² para a realização do cálculo da redução dos microrganismos após o contato com as soluções sanitizantes. Os resultados apresentam a média de 2 testes.

Tabela 12: Contagem de *Escherichia coli* nos cupons (branco / controle) antes da ação da solução sanitizante 0,1% e 0,2% e água à 85°C.

Solução / membrana	Log UFC/cm ²	Desvio padrão
Solução peracético 0,1% - PA*	4,77	0,65
Solução peracético 0,1% - PES**	4,95	0,98
Solução peracético 0,2% - PA*	4,95	0,55
Solução peracético 0,2% - PES**	4,69	0,62
Água à 85°C – PA*	4,69	0,80
Água à 85°C – PES**	4,84	0,74

*PA: Poliamida

**PES: Polietersulfona

De acordo com a **Tabela 13** a menor redução de microrganismos observada foi de 3,59 log UFC/cm² para a membrana de poliamida e 3,77 ciclos log para a membrana de polietersulfona. A variação entre a membrana de poliamida foi de 1,18 ciclos log e para a membrana de polietersulfona foi de 0,58 ciclo log.

Tabela 13: Redução da contagem (Log UFC/cm²) de *Escherichia coli* em nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução de ácido peracético na concentração de 0,1% durante 10 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,77	1,00	3,77	4,95	1,18	3,77
2	4,77	0,30	4,47	4,95	0,48	4,47
3	4,77	1,18	3,59	4,95	1,15	3,8
4	4,77	0,85	3,92	4,95	1,04	3,91
5	4,77	0,48	4,29	4,95	0,95	4,00
6	4,77	<0,3	4,77	4,95	0,60	4,35
7	4,77	0,85	3,92	4,95	0,90	4,05
8	4,77	<0,3	4,77	4,95	1,11	3,84
9	4,77	0,70	4,07	4,95	0,95	4,00
10	4,77	0,95	3,82	4,95	0,95	4,00

Com a solução sanitizante 0,1% durante 20 minutos de contato, a redução foi maior em relação ao tempo de contato de 10 minutos. A redução para as duas membranas esteve acima de 4 ciclos log UFC/cm². Dados apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14: Redução de *Escherichia coli* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução de ácido peracético na concentração de 0,1% durante 20 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,77	<0,3	4,77	4,95	<0,3	4,95
2	4,77	<0,3	4,77	4,95	<0,3	4,95
3	4,77	0,48	4,29	4,95	<0,3	4,95
4	4,77	<0,3	4,77	4,95	0,70	4,25
5	4,77	<0,3	4,77	4,95	0,78	4,17
6	4,77	<0,3	4,77	4,95	0,48	4,47

Membrana Poliamida				Membrana Polietersulfona		
Cupom	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
7	4,77	<0,3	4,77	4,95	0,30	4,65
8	4,77	0,30	4,47	4,95	<0,3	4,95
9	4,77	0,70	4,07	4,95	<0,3	4,95
10	4,77	0,60	4,17	4,95	0,48	4,47

A sanitização dos cupons com solução sanitizante 0,2% foi mais eficiente na redução dos microrganismos. Os dois tempos de contato utilizados foram eficientes, chegando a reduzir > 4 ciclos Log para poliamida e em 80% das membranas de polietersulfona. Estes dados mostram que duplicando a concentração do sanitizante, no tempo de 10 minutos, a eficiência também é aumentada. Os resultados estão apresentados nas **Tabelas 15 e 16**.

Tabela 15: Redução de *Escherichia coli* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,2% durante 10 minutos.

Membrana Poliamida				Membrana Polietersulfona		
Cupom	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,95	<0,3	4,95	4,69	0,78	3,91
2	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
3	4,95	0,30	4,65	4,69	<0,3	4,69
4	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
5	4,95	<0,3	4,95	4,69	0,48	4,21
6	4,95	<0,3	4,95	4,69	0,70	3,99
7	4,95	0,70	4,25	4,69	<0,3	4,69
8	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
9	4,95	0,78	4,17	4,69	<0,3	4,69
10	4,95	0,30	4,65	4,69	0,30	4,39

Tabela 16: Redução de *Escherichia coli* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,2% durante 20 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
2	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
3	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
4	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
5	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
6	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
7	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
8	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69
9	4,95	0,30	4,65	4,69	0,48	4,21
10	4,95	<0,3	4,95	4,69	<0,3	4,69

As análises realizadas com a água na temperatura de 85°C tiveram ótimos resultados para sanitização das membranas em ambos tempo de contato. Para o tempo de contato de 10 minutos, 60% das amostras de poliamida e polietersulfona a redução decimal foi > 4 log UFC/cm², reduzindo todo o número de microrganismos presente nos cupons. No tempo de contato de 20 minutos (**Tabela 17**) a redução foi maior, considerando que 90% das amostras tiveram 100% de eficiência para a remoção dos microrganismos.

Tabela 17: Redução de *Escherichia coli* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com água na temperatura de 85°C durante 10 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
2	4,69	<0,3	4,69	4,84	0,03	4,81

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
3	4,69	0,48	4,21	4,84	0,48	4,36
4	4,69	0,70	3,99	4,84	<0,3	4,84
5	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
6	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
7	4,69	0,48	4,21	4,84	<0,3	4,84
8	4,69	<0,3	4,69	4,84	0,48	4,36
9	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
10	4,69	0,30	4,39	4,84	0,70	4,14

Tabela 18: Redução de *Escherichia coli* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com água na temperatura de 85°C durante 20 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,69	0,3	4,39	4,84	<0,3	4,84
2	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
3	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
4	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
5	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
6	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
7	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
8	4,69	<0,3	4,69	4,84	0,48	4,36
9	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84
10	4,69	<0,3	4,69	4,84	<0,3	4,84

De acordo com a **Figura 25 e 26**, a quantidade de cupons de polietersulfona e poliamida com maior redução decimal foi apresentada para a concentração de 0,2% do ácido peracético em ambos tempos de contato (10 min e 20 min) e com água à temperatura de 85°C também nos dois tempos de contato.

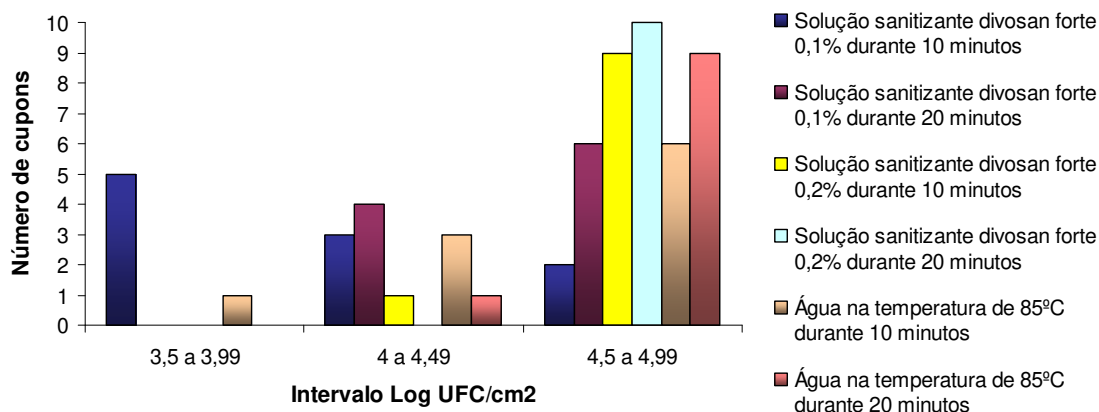


Figura 26: Número de cupons x número de redução de ciclos log/cm² da bactéria *Escherichia coli* em membranas de poliamida após ação dos sanitizantes.

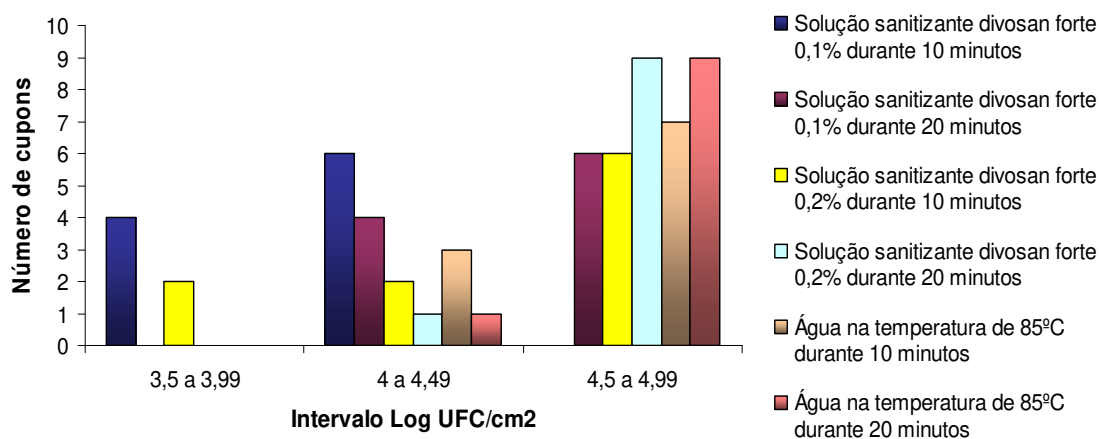


Figura 27: Número de cupons x número de redução de ciclos log/cm² da bactéria *Escherichia coli* em membranas de polietersulfona após ação dos sanitizantes.

5.6.2 Sanitização das membranas filtrantes após contato com suspensão de *Pseudomonas aeruginosa*

Foram analisadas amostras em duplicata dos cupons após contato com a cultura de bactérias para determinar o número de log UFC/cm² para a realização do cálculo da redução dos microrganismos após o contato com as soluções sanitizantes. Os resultados apresentam a média de 2 testes. **Tabela 19.**

Tabela 19: Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* nos cupons (branco) antes da ação do Ácido Peracético 0,1% e 0,2% e água à 85°C.

Solução / membrana	Log UFC/cm ²	Desvio padrão
Solução peracético 0,1% - PA*	4,77	0,65
Solução peracético 0,1% - PES**	4,845	0,92
Solução peracético 0,2% - PA*	4,3	0,42
Solução peracético 0,2% - PES**	4,69	0,62
Água à 85°C – PA*	4,905	1,11
Água à 85°C – PES**	4,775	0,74

*PA: Poliamida

**PES: Polietersulfona

A **Tabela 19** mostra que o número de *Pseudomonas aeruginosa* aderidas às membranas de polietersulfona e poliamida está entre 4,3 log e 4,90 log, variação de 0,60 log. Estes valores foram considerados para o cálculo da redução decimal dos microrganismos.

Tabela 20: Redução de *Pseudomonas aeruginosa* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,1% durante 10 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,77	0,95	3,82	4,95	1,18	3,77
2	4,77	1,08	3,69	4,95	0,48	4,47
3	4,77	1,18	3,59	4,95	1,15	3,8
4	4,77	0,48	4,29	4,95	1,04	3,91
5	4,77	0,70	4,07	4,95	0,95	4
6	4,77	<0,3	4,77	4,95	0,60	4,35
7	4,77	0,5	4,27	4,95	0,90	4,05
8	4,77	0,60	4,17	4,95	1,11	3,84
9	4,77	0,95	3,82	4,95	0,95	4
10	4,77	1,04	3,73	4,95	0,95	4

De acordo com a **Tabela 20** a menor redução de microrganismos observada foi de 3,59 ciclos log UFC/cm² para a membrana de poliamida e 3,77 ciclos log para a membrana de polietersulfona. A variação entre a membrana de poliamida foi de 1,18 ciclos log e para a membrana de polietersulfona foi de 0,58 log.

Com a solução sanitizante 0,1% durante 20 minutos de contato, a redução do Log foi maior em relação ao tempo de contato de 10 minutos. 90% dos cupons tiveram reduções acima de 4 log UFC/cm². Dados apresentados na **Tabela 21**.

Tabela 21: Redução de *Pseudomonas aeruginosa* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,1% durante 20 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,77	<0,3	4,77	4,95	<0,3	4,95
2	4,77	<0,3	4,77	4,95	<0,3	4,95
3	4,77	0,70	4,07	4,95	0,30	4,65
4	4,77	<0,3	4,77	4,95	0,70	4,25
5	4,77	0,30	4,47	4,95	0,48	4,47
6	4,77	<0,3	4,77	4,95	0,95	4
7	4,77	<0,3	4,77	4,95	<0,3	4,95
8	4,77	0,48	4,29	4,95	<0,3	4,95
9	4,77	0,70	4,07	4,95	0,85	4,1
10	4,77	0,95	3,82	4,95	1,04	3,91

A sanitização dos cupons com solução sanitizante 0,2% foi mais eficiente na redução dos microrganismos. Os dois tempos de contato utilizados foram eficientes, chegando a reduzir > 4 ciclos Log para poliamida e em 100% das membranas de polietersulfona. Estes dados mostram que duplicando a concentração do sanitizante, no tempo de 10 minutos, a eficiência também é aumentada. Os resultados estão apresentados nas **Tabelas 22 e 23**.

Tabela 22: Redução de *Pseudomonas aeruginosa* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,2% durante 10 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,3	0,30	4	4,69	<0,3	4,69
2	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
3	4,3	<0,3	4,3	4,69	0,30	4,39
4	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
5	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
6	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
7	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
8	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
9	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
10	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69

Tabela 23: Redução de *Pseudomonas aeruginosa* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com a solução sanitizante de ácido peracético na concentração de 0,2% durante 20 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
2	4,3	0,48	3,82	4,69	<0,3	4,69
3	4,3	<0,3	4,3	4,69	0,30	4,09
4	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
5	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
6	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69
7	4,3	0,48	3,82	4,69	<0,3	4,69
8	4,3	0,85	3,45	4,69	<0,3	4,69
9	4,3	0,60	3,7	4,69	<0,3	4,69
10	4,3	<0,3	4,3	4,69	<0,3	4,69

As análises realizadas com a água na temperatura de 85°C tiveram ótimos resultados para sanitização das membranas em ambos tempo de contato. Para o tempo de contato de 10 minutos, 100% das amostras de poliamida e polietersulfona a redução decimal foi $> 4 \log \text{UFC/cm}^2$, reduzindo todo o número de microrganismos presente nos cupons. No tempo de contato de 20 minutos (**Tabela 24**) a redução foi similar, onde também todas as amostras tiveram 100% de eficiência para a remoção dos microrganismos.

Tabela 24: Redução de *Pseudomonas aeruginosa* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com água na temperatura de 85°C durante 10 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
2	4,9	<0,3	4,9	4,77	0,30	4,47
3	4,9	0,30	4,6	4,77	<0,3	4,77
4	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
5	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
6	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
7	4,9	0,48	4,42	4,77	0,48	4,29
8	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
9	4,9	<0,3	4,9	4,77	0,48	4,29
10	4,9	0,48	4,42	4,77	0,30	4,47

Tabela 25: Redução de *Pseudomonas aeruginosa* em Log UFC/cm² nos cupons de membrana de poliamida e polietersulfona após contato com água na temperatura de 85°C durante 10 minutos.

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
1	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
2	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77

Cupom	Membrana Poliamida			Membrana Polietersulfona		
	Controle	Após sanitização	Redução	Controle	Após sanitização	Redução
3	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
4	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
5	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
6	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
7	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
8	4,9	0,30	4,6	4,77	<0,3	4,77
9	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77
10	4,9	<0,3	4,9	4,77	<0,3	4,77

De acordo com a **Figura 28 e 29**, a quantidade de cupons de polietersulfona e poliamida com maior redução decimal foi apresentada para a concentração de 0,2% do sanitizante em ambos tempo de contato (10 minutos e 20 minutos) e na água à temperatura de 85°C também nos dois tempos de contato.

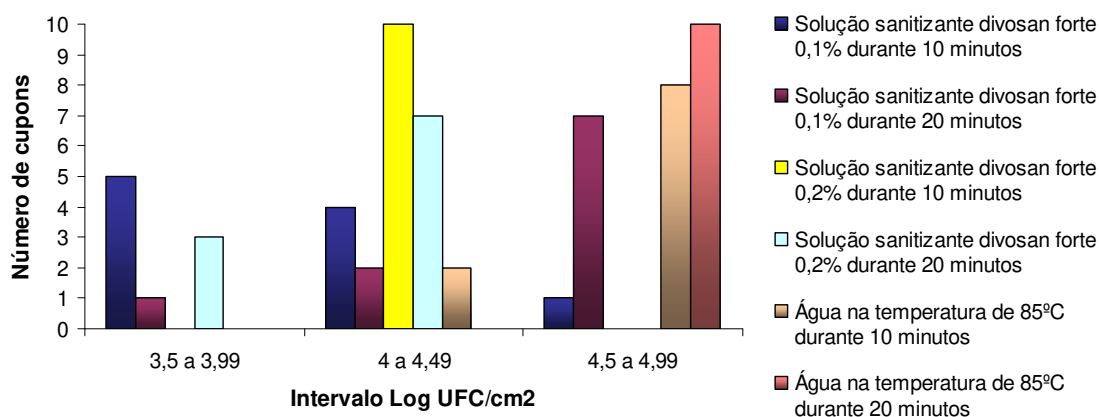


Figura 28: Número de cupons x número de redução de ciclos log/cm² da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em membranas de poliamida após ação dos sanitizantes.

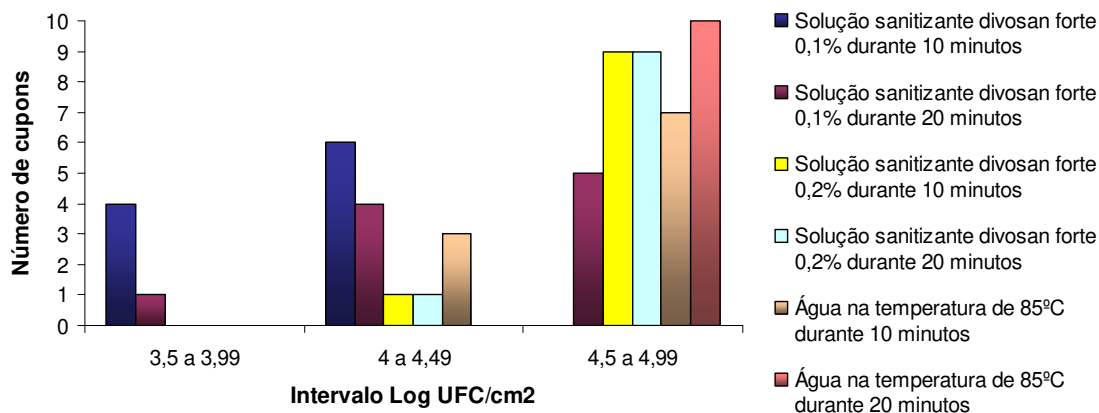


Figura 29: Número de cupons x número de redução de ciclos log/cm² da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em membranas de polietersulfona após ação dos sanitizantes.

Os resultados apresentados utilizando água à 85°C para sanitizar as membranas contaminadas com *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* estão de acordo com os estudos de Chmielewski e Frank (2006), onde biofilme de *Listeria monocytogenes* 3990 aderido em superfície de borracha foram eliminados após contato com calor à 80°C durante 15 minutos. A concentração inicial de biofilme era de 6.88 Log.

Todos os dados acima evidenciam que a utilização de sanitizantes à base de ácido peracético a partir de 0,1% e água à 85°C são eficientes para reduzir grande número das células de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* das membranas de polietersulfona e poliamida. A água à temperatura de 85°C e a solução sanitizante 0,2% em ambos tempo de contato (10 minutos e 20 minutos) foram o que apresentaram maior redução decimal dos microrganismos aderidos às membranas.

6 CONCLUSÕES

- As bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* mostraram-se capazes de formar biofilmes sobre as membranas de polietersulfona e poliamida nas diferentes temperaturas de contato (5°C, 25°C e 35°C) e tempos de contato (24h, 48h e 72h) favorecidas pelo aumento da temperatura. Este fato mostra que a temperatura e o tempo são um grande aliado para o aumento de células destes microrganismos nas membranas poliméricas. A temperatura de 5°C foi o parâmetro que mais influenciou na redução da velocidade de proliferação das células. É importante destacar, devido aos resultados apresentados, que em processos industriais o mais adequado é estocar as membranas filtrantes em câmara fria, caso não tenha realizado a sanitização, até a próxima utilização no processo a fim de controlar o crescimento das células microbianas.
- As membranas filtrantes não apresentaram entupimento após o contato por 72h com a cultura de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Este fato mostra que o contato das membranas com a solução de cultura das bactérias não provocou o entupimento das membranas e sim um leve aumento no diferencial de pressão das mesmas, aumentando aproximadamente 3 psi em cada membrana. Talvez uma quantidade superior de bactérias poderia provocar o entupimento do meio filtrante, através da filtração de um fluído com maior carga microbiana ou da exposição à este mesmo fluído.
- Na análise microscópica das membranas de poliamida e polietersulfona foi possível observar que os microrganismos estão em maior número de acordo com o aumento do tempo (72h de contato), no entanto ainda é evidenciado poros livres, o que também é mostrado na análise para verificar o de entupimento das membranas
- Os sanitizantes utilizados ofereceram grande eficiência na redução das bactérias aderidas nas membranas. A contração do sanitizante químico mais efetivo foi 0,2% para 10 e 20 minutos de contato, onde cerca de 80% dos cupons tiveram redução de > 4 log UFC/mL. A água na temperatura de 85°C em ambos os tempos de contato (10 minutos e 20 minutos) também ofereceu grande eficiência na redução

logarítmica dos microrganismos, onde 100% dos cupons apresentaram redução > 4 Log UFC/cm².

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N.C; ODORIZZI, A.C; GOULART. **Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP.** Revista da Saúde Pública, 36 (6):749-51, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. Portaria nº 15 de 23 de agosto de 1988. In: Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 05 de setembro de 1988.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005. In: Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

ALGIE, J.E. **The heat resistance of bacterial spores due to their partial dehydration by reverse osmosis.** Curr. Microbiol., n. 3, p. 287-290, 1980.

American Society for Testing and Materials (ASTM) – **Bubble point method.** F 316- 07.

American Society for Testing and Materials (ASTM) – **Practices for evaluating the resistance of plastics to chemical reagents.** D 543 – 06

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 Protection, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na Indústria de Alimentos.** 1.ed. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 181p.

AWWA. Manual of water supply practices, M 53 1st ed. **Microfiltration and ultrafiltration membranes for drinking water.** American water works association manual M53, 2005.

BALDRY, M.G.C. **The Bactericidal, fungicidal, and sporocidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid.** Journal. Exp. Med. N. 54, p.417-423, 1983.

BALDRY, M.G.C, FRASER, J.A.L. **Disinfection with peroxygens. In industrial Biocides**, edited by K.R.Payne, Wiley, N.Y, p. 91-116, 1988.

BANWART, G.J. **Basic Food Microbiology**, 2nd ed. Professor emeritus Department of microbiology the Ohio State University – Editora Chapman & Hall- p. 670-682, 1989.

BEAMAN, T.C; GERHARDI, P. **Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplasm dehydration, mineralization, and thermal adaptation.** Appl. Environment Microbiol. N. 52, p. 1242-1246, 1986.

BELL, R.G; DELACY, K.M. **Influence of NaNO₂ and oxygen on the germination and growth of bacillus licheniformis, a spoilage organis of chum- packed luncheon meat.** Journal. Appl. Bacteriol. N. 57, p. 523-530, 1984.

BENDER, G. R.; and MARQUIS, R. E. **Spore heat resistance and specific mineralization.** Appl Environmental Microbiology, 50(6): 1414-1421, December 1985.

Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, The proteobacteria. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley, editors; George M. Garrity, editor-in-chief, 2005.

BEUCHAT, L.R. **Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation of and colony formation by heated spores and vegetative cells of molds.** Appl. Environment microbial., n.41, p. 472-477,1981.

BLOCK, S.S. a **Desinfection, Sterilization and Preservation.** 2th ed. Professor de Bioengenharia, departamento de engenharia química – Universidade da Flórida, Gainesville, Flórida, p. 577- 578 – 1977

BLOCK, S.S. b **Desinfection, Sterilization and Preservation.** 2th ed. Professor de Bioengenharia, departamento de engenharia química – Universidade da Flórida, Gainesville, Flórida, p. 566- 567 – 1977.

BRAGULLA, S; LINTNER, K. **Basics in cleaning and disinfection for ultrafiltration, reverse osmosis and electro-dialysis**. Henkel Technical Information, March, p. 1-4, 1987.

BRÍÑEZ, W.J; ROIG-SAGUES'S, A.X; HERRERO, M, M. H; PEDEMONTE, T. L; GUAMIS, B. **Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli***. Food Control, V.17, P 516-521, 2006.

CHMIELEWSKI, R.A.N., FRANK, J.F. **A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber**. Science Direct. LWT 39 11 -19, 2006.

COOK, A.M; GILBERT, R.J. **Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. II. The effect of sporulating conditions and nature of the heating medium**. Journal Food technology. N.3, p.295-302, 1968.

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

DAVIDSON, P. M; BRANEN, A, L. **Antimicrobials in Foods**, 2nd ed. Revises and Expanded university de Idaho – Moscow – Idaho, 1972

DAVIS, B.D.;DULBECCO, R.; EISEN, H,N.; GINSBERG, H.S. **In Microbiology Including Human and Molecular Genetics**, 3rd ed. Harper and Row Publishers, Inc., London, p. 344-351, 1980.DAVIS, R.H. "Microfiltration". In: WINSTON HO, W.S., SIRKAR, K.K., REINHOLD V.N.. (Ed). **Membrane Handbook**, chapter 8. New York, 1992.

DIAS, M.F; FILHO, A.F. **Qualidade microbiológica de águas minerais em embalagens individuais comercializadas em Araraquara – SP – Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.18. nº 02, p. 177-181, abril/junho de 2007.

DOYLE, M.P.; MARTH, E.H. **Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. 1. effects of moist heat, age of conidia, and sporulation medium.** Journal Milk Food Technology, n.38, p.678-682, 1975.

DOYLE, M. P.; PADHYE, V. V. ***Escherichia coli*.** Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, p. 235-281, 1989

DYCHDALA, G. R. **New hydrogen peroxide-peroxyacetic acid disinfection.** Proc. 4th Conf. Chem. Disinfection, New York State University, Binghamton, NY, p. 315-334, 1988.

DYCHDALA, G.R., KOROMA, J.M. **Bactericidal activity of P3-oxonia active at different pH levels.** Henkel Corporation (unpublished).

EL BANNA, A.A.; HURST. A. **Survival in foods of *Staphylococcus aureus* grown under optimal and stresses conditions and the effect of some food preservatives.** Can. Journal Microbiology, n. 29, p.297-302, 1983

E. M.M. ROSSONI; C. C. GAYLARD. **Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy.** International Journal of Food Microbiology, vol. 61, p. 81-85, 2000

ENCYCLOPEDIA OF PUBLIC HEALTH, 2002. Disponível em: <http://www.answers.com/topic/escherichia-coli>

FRASER, J. A.L. **Novel applications of peracetic acid in industrial disinfection.** Specialty Chemicals n. 7, p. 178-186, 1987.

FREER, P.C., NOVY, F.G. **On the formation, decomposition and germicidal action of benzoylacetyl and diacetyl peroxides.** Am. Chem. Journal, n.27, p. 161-193, 1902.

FSF Metalúrgica. O filtro e o tamanho dos contaminantes – Disponível em: <http://fsfmetalurgica.com/blog/2010/9/o-filtro-e-o-tamanho-das-particulas-contaminantes/> acessado em 16/09/11.

GHAYENI, S.B; BEATSON, P. J; SCHENEIDER, R.P; FANE, A.G. **Adhesion of waste water bacteria to reverse osmosis membranes**. Journal of Membrane Science, v. 138, p. 29-42, 1998

GLEESON; GRAY. **The coliform index and waterborne disease, problems of microbial drinking water assessment**. E&FN Spon, London, 1997.

GOULD, G.W. **Recent advances in the understanding of resistance and dormancy in bacterial spores**. Journal Appl. Bacteriol., n.42, p.297-309, 1977.

GOULD, GW; DRING, G.J. **Heta resistance of bacterial endospores and comcept of an expanded osmoregulatory cortex**. US National Library of Medicine National Institutes of Health. 258 (5534):402-5, Dec 1975

GOMES, M.J.P. **Gênero *Pseudomonas* ssp**. Microbiologia Clínica, Labacvet, 2008.

Disponível em:

http://www.ufrgs.br/labacvet/pdfpseudomonas_aeruginosa_burkholderia.pdf. Acessado em 21/03/09.

GOMES, M.J.P. ***Escherichia coli***. Microbiologia Clínica, Labacvet, 2007. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/ecoli.pdf>. Acessado em 21/03/09.

GRAY, R.J.H; WITTER, L.D; ORDAL, X.J. **Characterization of mild thermal stress in *Pseudomonas fluorences* and its repairs**. Appl. Microbiol., n.26, p. 78-85, 1973.

GREENSPAN et al. (1955) apud Block, S.S., Disinfection, Sterilization, and Preservation. Fourth edition, Lea & Febiger, Philadelphia,1991.

HABERT, A.C., BORGES, C. P., NOBREGA, R. **Processos de Separação com membranas**. Rio de Janeiro, 2006.

HUI, Y.H., SHERKAT, F. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Routledge – USA, v. 4, p. 196, 2005.

STRATHMANN, H. "**Membranes and Membrane Separation Process**", in: Ulmann's Enciclopaedia of Industrial Chemical. 5th ed. **8**, 877-899, 1990.

HOLAH, J. T., HIGGS, C., ROBINSON, S., WORTHINGTON, D., SPENCELEY, H. **A conductance-based surface disinfection test for food hygiene**. Lett. Appl. Microbiol., n. 11, p. 255-259, 1990.

HUGO, W.B. **Inhibition and Destruction of the microbial cell**. Department of Pharmacy, University of Nottingham , Nottingham, england – 1971

KATSUI, N.; TSUCHIDO, T. , TAKANO, M.; SHIBASAKI, I. **Viability of heat-stressed celss of microorganisms as influenced by pre incubation and pos incubation temperatures**. Journal Appl. Bacteriology, n. 53, p.103-108, 1982.

KRZYWICHA, H. **Desinfectant activity of peracetic acid on the spores of bacteria**. Roor. Panstw. Zakl. Hig., n. 21, p. 595-599.

KWAST, R. H.; VERRIPS, C. T. **Heat resistance of *Salmonella senftenberg* 775 W at various sucrose concentrations in distilled water**. Eur. Journal Appl. Microbiology Biotechnology, n. 14, p. 193-201, 1982.

INTERNATIONAL BOTTLED WATER ASSOCIATION. 2007 statistics. Disponível em: www.bottledwater.org/public/Stats_2007.doc acessado em 28/03/2009.

IWERSEL, A. T; YAMANAKA, E.H.U; JUNIOR, L.F.L.L; MONTEIRO, C.L.B; COGO, L.L; BEUX, M.R. **Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais envasadas – Dinâmica populacional de *Pseudomonas aeruginosa***. B. CEPPA, Curitiba, v. 17, n. 02, Julho/dezembro 2009.

JAYASEKARA, N.Y; HEARD, G.M; COX, J.M; FLEET, G.H. **Association of micro-organisms with the inner surfaces of bottles of non-carbonated mineral waters**. Food microbiology, v. 16, nº fmic.1998.0228, p.115-128, 1999.

Jornal Informativo Cefar de Microbiologia. Cefar em notícias. **Pseudomonas aeruginosa**. Ano V. Edição 31- Jan/Fev/2009.

LEGNANI, P; LEONI, E; RAPUANO, R; TURIN, D; VALENTI C. **Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5 year study**. International Journal of food microbiology, vol. 53, p. 153-158, 1999.

MACEDO, J.A.B. **Biofimes bacterianos, uma preocupação na indústria farmacêutica**. Revista fármacos e medicamentos v. 2, n.7, P. 19-24, 2000.

MARQUES, S.C; REZENDE, J.G.O.S; ALVES, L.A.F; SILVA; B.C; ALVES, E; ABREU, L.R; PICCOLI, R.H. **Formation of Biofilms by Staphilococcus aureus on stainless stell and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers**. Brazilian journal of microbiology, v. 38, p. 538-543, 2007.

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

Membrane classification - Anisotropic (asymmetric) Membranes. Disponível em: http://www.separationprocesses.com/Membrane/MT_Ch02b.htm. Acessado em 01/06/11.

Microrganisms in Food – **Characteristics of microbial pathogens** – Editora Blackie Academic & professional.

Microbiologia Clínica – Labacvet 2007 – II – Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/ecoli.pdf> acessado em 13/09/10.

MORELLI, A.M.F. **Escherichia coli O157:H7: Ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes e resistência a sanitizantes**. 2008. 173f. Dissertação (Doutorado em ciência de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, MG.

ODLAUG, T.E. PFLUG, I. J. **Thermal destruction of *Clostridium botulinum* spores suspended in tomato juice in aluminum thermal death time tubes.** Appl. Environment Microbiology, n. 34, p. 23-29, 1977.

PADILHA, A. **Mercado mundial de águas envasadas, novas tendências y oportunidades.** Zenith international, congresso de águas minerais, Foz do Iguaçu, PR. Abinam 09/10/2008.

PANG, C.M; HONG, P; GUO, H; LIU, W.T. **Biofilm Formation Characteristics of Bacterial Isolates Retrieved from a Reverse Osmosis Membrane** *Environmental Science Technology*, V. 39 , p. 7541-7550 • DOI: 10.1021/es050170h • Publication Date (Web): 03 September 2005.

PASMORE, M; TODD, P; SMITH, S; BAKER, D; SILVERSTEIN, J; COONS, D; BOWMAN, C.N. **Effects of ultrafiltration membrane surface properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing biofouling.** Journal of Membrane Science, v, 194, p.15–32, 2001.

PAVLAS, M. **Desinfectant effect of chloramine B and peracetic acid on *Mycobacterium bovis*.** Microbiol. Immunol., n.16, p. 282-286, 1967.

PAVLOVA, I. B., KULO KOVSKII, A. V., **Submicroscopic study of bacteria, spores under effect of peracetic acid and some aspects of the mechanism of action of the preparation.** Zh. Mikrobiol., n.1, pg 37-41, 1978.

PALLERONI. ***Pseudomonas Migula*.** In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 1, N.R. Krieg & J.G. Holt (Eds). Williams and Wilkins, Baltimore, pp 141-199, 1984

POMPERMAYER, D.M.C ; GAYLARD, C.C. **The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene.** Food Microbiology, v. 17, p. 361-365, 2000, doi:10.1006/fmic.1999.0291

READ, R.B. JR.; BRADSHAW, J.G. **Irradiation of staphylococcal enterotoxin B**. Appl. Microbiology, n. 15, p. 603-605, 1967.

RESENDE, A. **Perfil microbiológico das águas minerais comercializadas no Distrito Federal**. Sábios. Revista de Saúde e Biologia, v.3, n.2, p. 16-22. Julho – Dezembro 2008.

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

ROSADO, M. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes**. 2009, 98f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 98p., 2009.

RUSSEL, A. D.; HARRIES, D. **Damage to *Escherichia coli* on exposure to moist heat**. Appl. Microbiology, n. 16, p. 1394 – 1399, 1968.

SANT'ANA, A; SILVA, S.C. F. L; FARANI, I.O.J; AMARAL, C.H.R; MACEDO, V.F. **Apostila: Qualidade microbiológica de águas minerais**. Curso Técnico Especial em controle de Alimentos, Senai, Vassouras – RJ, 2002

SCHEIE, P., EHRENSPECK, S. **Large surface blebs on *Escherichia coli* heated to inactivating temperatures**. Journal Bacteriology, n. 114, p. 814-818, 1973.

SCHWARTZ, J.B. **Sterilizing filtration of liquids**. PDA Journal of pharmaceutical Science and technology n. 26, v. 52, n. S1, 1998.

SENIOR, D; DEGE, N – **Technology of Bottled Water (Book)** – 2nd ed., p. 325 – 326, 2005.

SENIOR, D; DEGE, N - **Technology of Bottled Water (Book)** – 2nd ed., p. 326 – 327, 2005.

SOUZA, J.B; DANIEL, L.A. **Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de E. coli, Colifagos e C. perfringes em água com elevada concentração de matéria orgânica.** Eng. sanit. Ambiental, v.10 - nº 2, p. 111-117, 2005.

TAMAGNINI, L.M; GONZALES, R.D. **Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water.** Journal of applied microbiology, vol 83. p. 91-94, 1997.

TANCREDI, R.C.P; CERQUEIRA, E.; MARINS, B.P. **Águas minerais consumidas na cidade do Rio de Janeiro: Avaliação da qualidade sanitária.** Artigo da Vigilância Sanitária. 18.12.2002.

TODAR, K. ***Pseudomonas aeruginosa*.** On line textbook of bacteriology, 2008. disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>

TORREGGIANI, D., TOLEDO, R. T. ***Influence of sugars on heat inactivation, injury and repair of Saccharomyces cerevisiae.*** Journal Food Science, n. 51, pg. 211-215, 1986.

TSUCHIDO, T.; KATSUI, N.; TAKEUCHI, A.; TAKANO, M.; SHIBASAKI, I. **Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment.** Appl. Enviroment Microbiology, n. 50, p. 298-303, 1985.

XAVIER, J.B. PICIOREANU, C; ALMEIDA, J.S; LOSSDRECHT, M.C.M.V. **Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes.** Boletim de Biotecnologia, 2005.

YUN, M.A; YEON, K.M; PARK; LEE, C.H; CHUN, J; LIM.D.J. **Characterization of biofilm structure and its effect on membrane permeability in MBR for dye wastewater Treatment.** Water Research, v. 40, p. 45-52, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A

Análise de variância dos resultados de aderência com *E. coli*

As **Tabelas A1 e A2** apresentam a análise de variância dos valores de Log UFC/cm² de células de *Escherichia coli* aderidas às membranas de poliamida e polietersulfona. A análise foi realizada para as temperaturas de 5, 25 e 35°C e tempos de contato de 24, 48 e 72h através do programa Minitab 14.

Tabela A1: Análise ANOVA para *Escherichia coli* em membranas de poliamida.

Fator de Variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	p- valor
Temperatura	2	10,402	5,201	29,61	0,001
Erro	6	1,054	0,176		
Total	8	11,456			

F tabelado: 5,14
 $R^2 = 0,90$
 R^2 ajustado = 0,87

Tabela A2: Análise ANOVA para *Escherichia coli* em membranas de polietersulfona.

Fator de Variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	p- valor
Temperatura	2	10,410	5,205	25,25	0,001
Erro	6	1,237	0,206		
Total	8	11,647			

F tabelado: 5,14
 $R^2 = 0,89$
 R^2 ajustado = 0,85

Apêndice B

Análise de variância dos resultados de aderência com *Pseudomonas aeruginosa*

As **Tabelas B1 e B2** apresentam a análise de variância da população (log UFC/cm²) de *Pseudomonas aeruginosa* aderidas às membranas de poliamida e polietersulfona. A análise foi realizada para as temperaturas de 5, 25 e 35°C e tempos de contato de 24, 48 e 72h.

Tabela B1: Análise ANOVA para *Pseudomonas aeruginosa* em membranas de poliamida.

Fator de Variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	p- valor
Temperatura	2	6,237	3,119	6,07	0,036
Erro	6	3,082	0,514		
Total	8	9,319			

F tabelado: 5,14
 $R^2 = 0,66$
 R^2 ajustado = 0,55

Tabela B2: Análise ANOVA para *Pseudomonas aeruginosa* em membranas de polietersulfona.

Fator de Variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	p- valor
Temperatura	2	7,737	3,868	5,95	0,038
Erro	6	3,899	0,650		
Total	8	11,636			

F tabelado: 5,14
 $R^2 = 0,66$
 R^2 ajustado = 0,55