

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

**BIOFILME DE *Enterococcus faecium* EM SUPERFÍCIE DE
AÇO INOXIDÁVEL: CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA,
MODELAGEM E CONTROLE POR AGENTES
SANITIZANTES**

Marcília Santos Rosado

Bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Orientador

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

Campinas - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R71b Rosado, Marcília Santos
Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável:
modelagem e controle por agentes sanitizantes / Marcília Santos
Rosado. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biofilmes. 2. *Enterococcus faecium*. 3. Microbiologia preditiva.
4. Sanitizantes. 5. Queijo de coalho. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Biofilm of *Enterococcus faecium* in surface of stainless steel: modeling and control by sanitizers agentes

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biofilms, *Enterococcus faecium*, Predictive microbiology, Sanitizers, Coalho cheese

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Luiz Antônio Viotto

Izildinha Moreno

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

MARCÍLIA SANTOS ROSADO

**BIOFILME DE *Enterococcus faecium* EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL:
CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA, MODELAGEM E CONTROLE POR
AGENTES SANITIZANTES**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)

Dra. Izildinha Moreno
(Membro Titular)

Prof. Dr. Luiz Antonio Viotto
(Membro Titular)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro Suplente)

Dra. Maristela da Silva do Nascimento
(Membro Suplente)

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."
Martin Luther King

A Deus e a Nossa Senhora,
aos meus pais José Francisco e Marta,
ao meu noivo Wellington,
as minhas irmãs Márcia e Marli,
aos meu sobrinhos Ingrid, Vitor e Manuela,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida, por todo amor e bondade, e a Nossa Senhora pela proteção de mãe e por estar comigo em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis.

Aos meus pais José Francisco e Marta por todo amor, dedicação, por me apoiarem sempre em minhas decisões e pela presença incondicional.

Ao meu amado noivo Wellington, por todo amor, compreensão, incentivo, por caminhar junto comigo tornando minha vida muito mais feliz.

Às minhas irmãs Márcia e Marli pelo carinho, conselhos, presença e apoio.

Aos meus sobrinhos Ingrid, Vitor e Manuela por todo carinho, amor e por encherem meus dias de alegria.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação, confiança depositada, ensinamentos e por todo apoio na realização deste trabalho.

Aos membros da banca, Dra. Izildinha Moreno, Prof. Dr. José Luiz Pereira, Prof. Dr. Luiz Antônio Viotto, e Dra. Maristela da Silva do Nascimento, pela disponibilidade, valiosas sugestões e correções da dissertação.

À Dra. Dirce Kabuki, pela amizade, apoio no desenvolvimento deste trabalho, ensinamentos e sugestões.

Ao Prof. Dr. Nélio José de Andrade pela amizade, ensinamentos e valiosas sugestões.

Aos companheiros do laboratório de Higiene e Legislação: André, Celina, D. Denir, Isabela, Maria Amélia, Marisa, Meg, Raquel e Vanessa, pela ajuda e momentos compartilhados.

À Juliana Perri e Luciana Esper pela amizade e grande contribuição para realização deste trabalho.

Aos funcionários do DTA, Biblioteca e Secretaria de Pós-Graduação pela contribuição na realização deste trabalho.

À minha afilhada Esther por todo carinho e amor.

À amiga Roberta Careli pela amizade, conselhos e incentivo desde a época de iniciação científica.

À amiga Ana Cláudia pela amizade, por todos os conselhos e orações.

Aos amigos da graduação: Aniella, Hermínia, Natan, Patrícia e Rafaela pela amizade e agradável convivência.

Às companheiras de república Lígia, Luciana e Maricy pela acolhida.

À Fundação André Tosello pela cultura bacteriana concedida.

À Universidade Estadual de Campinas, a Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Enterococcus</i>	3
2.2 Adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos	5
2.2.1 Fatores que influenciam na adesão e formação de biofilmes bacterianos	11
2.2.2 Microrganismos envolvidos na formação de biofilmes	13
2.2.2.1 <i>Enterococcus</i> e a formação de biofilmes na indústria de alimentos	14
2.2.3 Inativação de microrganismos aderidos em superfícies utilizadas na indústria de alimentos	15
2.2.3.1 Ácido peracético (APA)	18
2.2.3.2 Hipoclorito de sódio	19
2.3 Superfícies utilizadas na indústria de alimentos	21
2.4 Utilização de microscopia para avaliação da formação de biofilme	24
2.5 Microbiologia preditiva	26
OBJETIVOS	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Microrganismos e meios de cultura utilizados	29
4.2 Caracterização tecnológica	29
4.2.1 Atividade em leite tornassolado	29
4.2.2 Capacidade acidificante	30
4.2.3 Produção de diacetil	31
4.3 Contagem de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> no leite cru	32
4.4 Curva de Crescimento	32
4.5 Avaliação da formação de biofilmes	33
4.5.1 Superfícies utilizadas	33
4.5.2 Determinação da formação do biofilme bacteriano	34

4.5.3	Determinação do número de células aderidas	36
4.5.3.1	Contagem padrão em placas (CPP)	36
4.5.4	Análise estatística dos resultados	37
4.5.5	Verificação experimental do modelo encontrado	37
4.6	Microscopia eletrônica de varredura	37
4.7	Avaliação da eficiência dos sanitizantes	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Caracterização tecnológica	40
5.1.1	Atividade em leite tornassolado	40
5.1.2	Capacidade acidificante	42
5.1.3	Produção de diacetil	44
5.2	Contagem de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> no leite cru	45
5.3	Curva de crescimento	46
5.4	Avaliação da formação de biofilme de <i>Enterococcus faecium</i>	48
5.4.1	Avaliação da rugosidade	48
5.4.2	Formação de biofilme de <i>Enterococcus faecium</i> em superfície de aço inoxidável	48
5.4.3	Modelagem da adesão e formação de biofilme	52
5.4.4	Verificação experimental do modelo encontrado	56
5.5	Microscopia eletrônica de varredura	57
5.6	Avaliação da eficiência dos sanitizantes	61
6.	CONCLUSÕES GERAIS	71
	REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo teórico da formação de biofilme bacteriano	7
Figura 2	Esquema simplificado de formação de biofilmes bacterianos	9
Figura 3	Reação de formação do ácido peracético	18
Figura 4	Reação de dissociação do hipoclorito de sódio em solução aquosa	20
Figura 5	Fotomicrografia de superfície de aço inoxidável AISI 304 observada por microscopia eletrônica de varredura submetida ao processo de adesão por <i>Pseudomonas fluorescens</i> a 25 °C por 5 dias, nos aumentos a) 1500 x, b) 4000 x	25
Figura 6	Avaliação de <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec isolado de queijo de coalho em leite tornassolado, após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 14 dias da esquerda para direita respectivamente	41
Figura 7	Avaliação de <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569 em leite tornassolado, após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 14 dias da esquerda para direita respectivamente	41
Figura 8	Capacidade de acidificação de <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec isolado de queijo de coalho artesanal, em leite no período de 0 a 48 horas, de acordo com o modelo de Barany e Roberts (1995) ($y(t) = y_0 + (\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)} - 1}{e^{y_{\text{máx}} - y_0}} \right)$)	43
Figura 9	Crescimento de <i>Enterococcus</i> spp. presente do leite cru em meio diferencial ágar KF <i>Streptococcus</i> , após incubação a 35 °C por 48 horas	45
Figura 10	Crescimento de <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569 em meio diferencial ágar KF <i>Streptococcus</i> , após incubação a 35 °C por 48 horas	45
Figura 11	Curva de crescimento de <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec isolado de queijo de coalho, em caldo MRS <i>Lactobacilli</i> , incubado a 35 °C durante 24 horas, de acordo com o modelo de Barany e Roberts (1995) ($y(t) = y_0 + (\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)} - 1}{e^{y_{\text{máx}} - y_0}} \right)$)	47

Figura 12	Gráfico de Pareto para análise dos efeitos dos fatores na variável resposta	53
Figura 13	Superfície resposta (a) e curvas de contorno (b) em função do tempo de contato e temperatura de exposição para adesão de <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec em aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4	55
Figura 14	Fotomicrografia de superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, não submetido ao processo de adesão, observada por microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de: a) 800 x, b) 1500 x	57
Figura 15	Fotomicrografia observada por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, submetida ao processo de adesão por <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec a 4,5 °C por 4 dias, nos aumentos de: a) 1500 x, b) 4000 x, c) 6000 x, d) 8000 x	58
Figura 16	Fotomicrografia observada por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, submetida ao processo de adesão por <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec a 25 °C por 4 dias, nos aumentos de: a) 1500 x, b) 4000 x, c) 6000 x, d) 8000 x	59
Figura 17	Fotomicrografia observada por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, submetida ao processo de adesão por <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec a 39,5 °C por 6,8 dias, nos aumentos de: a) 800 x, b) 1500 x, c) 1500 x, d) 4000 x	60
Figura 18	Contagem de <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec recuperado em superfície de aço inoxidável, após ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 100 mg.L ⁻¹ e ácido peracético a 300 mg.L ⁻¹	65
Figura 19	Número de reduções decimais de biofilme de <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec em aço inoxidável, após ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 100 mg.L ⁻¹ e ácido peracético a 300 mg.L ⁻¹	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos principais tipos de superfícies utilizadas na indústria de alimentos	23
Tabela 2	Delineamento composto central rotacional para relação entre as variáveis tempo de contato e temperatura de exposição	35
Tabela 3	Codificação das variáveis do delineamento composto central rotacional	35
Tabela 4	Relação entre temperatura de exposição e tempo de contato	36
Tabela 5	Formação de biofilme de <i>Enterococcus faecium</i> em superfície de aço inoxidável avaliada pela contagem padrão em placas	49
Tabela 6	Contagem de <i>Enterococcus faecium</i> no caldo MRS <i>Lactobacilli</i> após dois dias de incubação	50
Tabela 7	Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de <i>Enterococcus faecium</i> em aço inoxidável	52
Tabela 8	Coeficientes significativos do modelo	53
Tabela 9	Comparação da média dos resultados da adesão de <i>Enterococcus faecium</i> em aço inoxidável obtidos experimentalmente e pelo modelo preditivo	56
Tabela 10	<i>Enterococcus faecium</i> 946Ec aderido em superfície de aço inoxidável após 10 minutos de contato com o sanitizante hipoclorito de sódio a 100 mg.L ⁻¹	63
Tabela 11	<i>Enterococcus faecium</i> 946Ec aderido em superfície de aço inoxidável após 10 minutos de contato com o sanitizante ácido peracético a 300 mg.L ⁻¹	64
Tabela 12	Número de reduções decimais de biofilme de <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec em log UFC. cm ⁻² após ação do hipoclorito de sódio a 100 mg.L ⁻¹	66
Tabela 13	Número de reduções decimais de biofilme de <i>Enterococcus faecium</i> 946Ec em log UFC. cm ⁻² após ação do ácido peracético a 300 mg.L ⁻¹	67

RESUMO

Dentre os microrganismos que apresentam capacidade de aderir e formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos, como equipamentos e utensílios, estão às bactérias do gênero *Enterococcus*, presentes em alimentos como leite e derivados. Sua presença em queijos tem sido muito estudada por sua capacidade de conferir características tecnológicas desejáveis ao produto. Este trabalho objetivou avaliar as características tecnológicas de *Enterococcus faecium* 946Ec, isolado de queijo de coalho, a possível formação de biofilme em superfície de aço inoxidável e seu controle por agentes sanitizantes. A cultura de *E. faecium* 946Ec foi caracterizada tecnologicamente, apresentando lenta produção de ácido, baixa atividade proteolítica e produção de diacetil; a curva de crescimento no caldo MRS apresentou contagem de $1,48 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ após 24 horas. A avaliação da formação de biofilme foi realizada em cupons de aço inoxidável AISI 304, com rugosidade média de 0,366 µm, nos tempos de 0, 1,2, 4, 6,8 e 8 dias e temperaturas de 4,5, 10,5, 25, 39,5 e 45,5 °C, segundo delineamento composto central rotacional. O inóculo inicial utilizado foi de aproximadamente 1×10^4 UFC.cm⁻². A análise de variância mostrou ajuste significativo ($p < 0,05$) do modelo, permitindo a construção de um modelo matemático capaz de prever a adesão em função do tempo e temperatura. A faixa ótima para a formação do biofilme foi observada nas combinações de 3 a 7,5 dias e 22 a 43 °C. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu a visualização das topografias, das bactérias aderidas e produção e exopolissacarídeos. A contagem média a 25 °C por 4 dias foi de $4,08 \times 10^5$ UFC.cm⁻² pela MEV, bem próxima a obtida por contagem padrão em placas de $8,93 \times 10^5$ UFC.cm⁻². A ação de hipoclorito de sódio 100 mg.L⁻¹ Cloro Residual Total (CRT) e ácido peracético 300 mg.L⁻¹ Ácido Peracético (APA) sobre os biofilmes de *E. faecium* formados na superfície de 60 cupons de aço inoxidável, por 10 minutos, foram avaliados e os microrganismos foram detectados em 60 e 57 cupons, com reduções decimais de 3,00 e 4,02 ciclos log UFC.cm⁻² respectivamente. Embora o ácido peracético tenha sido o mais eficiente, o microrganismo não foi eliminado nos tratamentos, o que demonstra a dificuldade de sanitização das superfícies após a formação do biofilme.

ABSTRACT

Among the microorganisms that exhibit ability to adhere and form biofilms on surfaces of food processing, such as equipment and utensils, are the bacteria of the genus *Enterococcus*, present as contaminants in foods such as milk and dairy products. Its presence in cheese has been widely studied for its capacity to provide the technological characteristics desirable product. The objective of this work was to evaluate the technological characteristics of *Enterococcus faecium* 946Ec, isolated from the artisanal Coalho cheeses, the possible formation of biofilms in surface of stainless steel and its control by sanitizers. The culture was characterized technologically, as a low acid producer, with low proteolytic activity and a diacetyl producer. The curve of growth of *Enterococcus faecium* 946Ec in MRS broth presented counts of $1,48 \times 10^9$ CFU.mL⁻¹ after 24 hours. The evaluation of the biofilm formation was realized in coupons from stainless steel AISI 304, with roughness average of 0,366 μm , in times of 0, 1,2, 4, 6,8 and 8 days and in temperatures of 4,5; 10,5; 25; 39,5 and 45,5 $^{\circ}\text{C}$, according to a central composite design. The analysis of variance indicated the significant ($p < 0,05$) adjust of the model, allowing the construction of a mathematical model capable of predicting the adhesion in function of time and temperature. The optimum interval for the formation of biofilms was observed in combinations of 3 to 7,5 days and 22 to 43 $^{\circ}\text{C}$. The scanning electron microscopy allowed the visualization of the topography, the biofilm formation and exopolysaccharides production. The average counting at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 4 days was $4,08 \times 10^5$ CFU.cm⁻² using the SEM method, compared with results of the standard plate count of $8,93 \times 10^5$ CFU.cm⁻². The action of sodium hypochlorite sanitizers 100 mg.L⁻¹ Total Residual Chlorine (TRC) and peracetic acid 300 mg.L⁻¹ Peracetic Ácid (PAA), during 10 minutes, was evaluated in 60 coupons with biofilm formation. The microorganism was detected in 57 and 60 coupons submitted to peracetic acid and sodium hypochlorite respectively, with decimal reductions of 3,00 and 4,02 cycles log CFU.cm⁻² respectively. Although peracetic acid has been the most efficient, the microorganism has not been eliminated in the treatments, which demonstrates the difficulty of sanitization of the surfaces after the biofilm formation.

1 INTRODUÇÃO

Apesar do avanço tecnológico dos últimos anos, um grande problema para as indústrias de processamento de alimentos consiste no controle do estado higiênico-sanitário das superfícies de equipamentos e utensílios, que podem se tornar fontes potenciais de contaminação por microrganismos. Os alimentos contaminados podem sofrer o processo de deterioração ou mesmo se tornarem veículos de doenças causadas por microrganismos patogênicos.

Uma grande diversidade de microrganismos apresentam capacidade de aderir e formar biofilme. Os mecanismos de adesão e formação de biofilmes bacterianos têm sido estudados nos últimos anos, na tentativa de compreender e controlar os processos, pois além de aumentar a resistência à ação de sanitizantes, podem constituir um foco de contaminação dos alimentos.

Vários materiais são utilizados na construção de equipamentos e suas superfícies devem apresentar facilidade de higienização e propriedades anticorrosivas e antiaderentes, como forma de minimizar a formação de biofilmes. Nas indústrias de alimentos o material mais utilizado é o aço inoxidável.

A metodologia para quantificação dos microrganismos aderidos é outro ponto a ser considerado; atualmente, vários métodos microscópicos têm sido utilizados para avaliar o processo de adesão e formação de biofilmes, sendo recomendados para visualização bacteriana e da microtopografia das superfícies, como a microscopia eletrônica de varredura.

A utilização de modelos matemáticos preditivos é uma importante ferramenta para avaliação e controle da formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos, pois podem auxiliar na descrição dos fatores que interferem neste processo, evidenciando sua influência.

Bactérias do gênero *Enterococcus* estão dentre os microrganismos capazes de se aderir com possível formação de biofilme em superfícies de equipamentos e utensílios de aço inoxidável, constituindo assim uma fonte potencial de contaminação dos alimentos.

Enterococcus são freqüentemente encontrados em leite e derivados, principalmente em queijos, devido a características como resistência à pasteurização, por serem termodúricos, e à refrigeração, por serem psicotróficos. Várias características tecnológicas, como a produção de compostos sápidos e aromáticos, têm sido relacionadas a estes microrganismos, sendo possivelmente os responsáveis pelo desenvolvimento de sabor e aroma característicos em alguns queijos.

Estas bactérias podem contaminar os alimentos de diversas formas, tanto pelo contato direto com fezes de animais, como por contato indireto através de água contaminada, ar ambiente, pêlo de animal ou equipamentos de ordenha e armazenamento.

Apesar de serem relatados como causadores de infecções em humanos na área médica, não há nenhuma confirmação quanto a enfermidades transmitidas por esse microrganismo via alimento, havendo possivelmente grandes diferenças entre as espécies presentes em hospitais e nos alimentos.

Esta é uma pesquisa que combina a avaliação da adesão e formação de biofilme bacteriano, com a utilização de um modelo matemático preditivo para avaliar a influência de variáveis como tempo de contato e temperatura de exposição neste processo, além de avaliar a eficiência da ação de sanitizantes normalmente utilizados na indústria de alimentos e nas concentrações recomendadas pelos fabricantes, frente ao biofilme formado. O *Enterococcus faecium*, embora esteja presente nos alimentos em decorrência de uma contaminação, possivelmente é responsável por promover características tecnológicas desejáveis, como no caso dos queijos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias do gênero *Enterococcus*

Bactérias do gênero *Enterococcus* são microrganismos ubiqüitários, presentes no solo, plantas, em diversos alimentos, e fazem parte da microbiota do trato intestinal de vertebrados. São descritos como bactérias produtoras de L-ácido láctico, homofermentativos, cocos, Gram positivos, catalase negativa, anaeróbicos facultativos, e se diferem dos demais cocos homofermentadores por apresentarem crescimento a 10 e 45 °C, a pH 9,6, em presença de até 6,5% de NaCl e 40% de sais biliares (GELSOMINO et al., 2001; DOMIG; MAYER. KNEIFEL, 2003; FRANZ, et al., 2003). Compreendem mais de 20 espécies, sendo que *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* estão presentes em maior número, especialmente em alimentos (GIRAFFA, 2003).

A presença de *Enterococcus* em alimentos tem sido alvo de inúmeros estudos, segundo Frans et al. (2003), esta é uma importante bactéria em produtos fermentados como derivados lácteos e cárneos, sendo muito utilizada também como probióticos.

As etapas de processamento de alguns alimentos, como por exemplo, a salga e a defumação expõem os microrganismos a condições adversas de temperatura e salinidade, e como nestas condições as bactérias do gênero *Enterococcus* apresentam resistência, podem se multiplicar e até promover a deterioração do produto (GIRAFFA, 2002). Enquanto alguns estudos mostram a relação entre a presença desta bactéria e a deterioração de alguns produtos alimentares, outros defendem o seu papel de promover características sensoriais desejáveis em queijos e produtos fermentados (FOLQUIÉ-MORENO et al., 2006).

Gomes et al. (2008) avaliaram a presença de *Enterococcus* em 120 amostras de alimentos, sendo 30 de queijos, 30 de produtos cárneos, 30 de vegetais, 11 de leite pasteurizado e 19 de leite cru, e encontraram o microrganismo em todas as classes de alimentos analisadas, demonstrando a

ampla capacidade de sobrevivência e multiplicação em diferentes tipos de alimentos.

Freqüentemente presentes em leite, as bactérias do gênero *Enterococcus* podem contaminá-lo de diversas maneiras, por contato direto com fezes de animais, ou por contato indireto através de água contaminada, ar ambiente, pêlo de animal ou equipamentos de ordenha e armazenamento (GELSOMINO et al., 2001).

Ocorrem naturalmente como “Non Starter Lactic Acid Bactéria” em grande variedade de queijos produzidos tanto a partir de leite cru como pasteurizado, devido ao fato de ser um microrganismo termodúrico capaz de resistir à pasteurização, refrigeração e ao processo de maturação (GIRAFFA, 2003).

Suzzi et al. (2000), encontraram várias estirpes de *Enterococcus* em queijo artesanal italiano, nos quais *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* apresentaram maior porcentagem de desenvolvimento ao longo dos 60 dias de maturação. Em outra pesquisa Morandi et al. (2005) analisaram a presença destes microrganismos em diversos queijos italianos, encontrando altas contagens, especialmente nos queijos elaborados a partir de leite cru.

Em pesquisa realizada por Carvalho et al. (2005), para identificação de bactérias ácido lácticas presentes em queijo tipo coalho artesanal, *Enterococcus* foi a estirpe bacteriana predominante com 60,3% do total de bactérias encontradas, sugerindo que durante o processamento deste queijo, estas poderiam ser selecionadas pela resistência a elevadas temperaturas, como na etapa de cozimento.

Vários estudos indicam que a presença de *Enterococcus* em queijos tem caráter positivo influenciando tanto no processamento quanto na maturação de queijos tradicionais como Manchego, Mozzarella, Monte Veronese, Fontina, Caprino, Serra, Venaco e Comté. Nestes queijos, estas bactérias representam a maior porcentagem na microflora inicial e, em alguns casos, é o microrganismo predominante no final do período de maturação. Os níveis destas bactérias na massa podem chegar de 10^4 a 10^6 UFC.g⁻¹ e no final do período de maturação,

de 10^5 a 10^7 UFC.g⁻¹. *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* são as espécies mais relatadas (GIRAFFA, 2003).

Assim, a presença de *Enterococcus* em queijos tem sido relacionada a várias características tecnológicas como capacidade acidificante, geralmente apresentam baixa atividade proteolítica e peptidolítica e capacidade de metabolizar o citrato em componentes sápidos e aromáticos como acetato, acetaldeído e diacetil, participando possivelmente do desenvolvimento de sabor e aroma durante a maturação (GIRAFFA, 2003).

No entanto, Folquié-Moreno et al. (2006), afirmaram que dentre as bactérias lácticas, as pertencentes ao gênero *Enterococcus* são as que causam maior controvérsia. A avaliação das implicações deste microrganismo em relação à segurança de alimentos é de grande importância, já que atualmente é considerado um patógeno humano oportunista emergente, sendo constantemente relatado como causador de infecções hospitalares como bacteremia, endocardites e infecções de trato urinário, sendo os pacientes imuno-comprometidos ou em tratamento intensivo os principais afetados (MORANDI et al., 2006).

O maior interesse está voltado aos *Enterococcus* vancomicina-resistente (VRE), devido a este antibiótico ser amplamente ministrado em casos de infecções múltiplas (MORANDI et al., 2006). No entanto segundo Frans, Holzapfel e Stiles (1999), a patogenicidade neste caso não pode ser explicada apenas pelo perfil de resistência aos antimicrobianos, sendo necessário levar em consideração também outros fatores de virulência.

2.2 Adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos

Na natureza e nos alimentos, os microrganismos aderem às superfícies e crescem como uma comunidade (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

As superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com os alimentos durante o processamento, não devem contaminá-los ou aumentar a incidência de microrganismos alteradores ou patogênicos (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

A contaminação destas superfícies por microrganismos tem gerado uma crescente preocupação para as indústrias. Quando em condições favoráveis as bactérias podem aderir e se reproduzir, e se não forem removidas de forma eficiente, estas podem promover a formação dos biofilmes bacterianos (BOWER; McGUIRE; DAESCHEL, 1996).

Os biofilmes podem colonizar todos os ambientes passíveis de habitação por microrganismos, e podem ser considerados dentre as estruturas biológicas mais antigas da terra (SCHNEIDER, 2007), já tendo sido encontrados fósseis em rochas de cerca de 3,5 bilhões de anos (WESTALL, 2003).

Em 1943, Zobell fez a primeira descrição de biofilmes, ao estudar a preferência de bactérias marinhas em crescer em superfícies e verificou que a presença de matérias orgânicas e outras partículas favoreciam o processo de adesão. Em 1995, Costerton et al., definiu biofilmes como uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, que envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, encontram-se aderidos entre si e/ou a uma superfície ou interface.

Recentemente Schneider (2007), propôs uma definição para biofilmes microbianos que além de permitir sua clara diferenciação das células planctônicas, inclui todas as formas de vida microbiana com características de biofilme. Segundo o autor “biofilmes são comunidades de microrganismos, aderidas a superfícies ou suspensas em solução, cujas células podem ou não estar envoltas por uma matriz de exopolímeros, onde a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa também nas gerações seguintes”.

Segundo Andrade, Bridgeman e Zottola (1998), durante o processo de adesão as células que se aderem são denominadas de sésseis, enquanto que as que permanecem livres são denominadas de planctônicas. Ronner e Wong (1993) consideram que para ser denominado biofilme, o número mínimo de células aderidas deve ser de 10^5 UFC.cm⁻².

Nos últimos anos grandes esforços têm sido dedicados para promover a identificação de fatores relacionados à formação de biofilmes bacterianos (LATASA et al., 2006).

Vários mecanismos para adesão bacteriana em superfícies têm sido propostos. Segundo Marshall et al. (1971), o processo de adesão e formação de biofilme bacteriano pode ser dividido em duas etapas (FIGURA 1). A primeira é dita reversível, pois nesta etapa o microrganismo ainda está fracamente aderido à superfície por meio de forças de van der Waals e interações eletrostáticas, o que torna fácil a remoção das células bacterianas. A segunda etapa é dita irreversível, já que o tempo de aderência inclui adesão física da célula à superfície por material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzido pelo microrganismo, denominado matriz de glicocálix. O glicocálix é produzido após o processo de adesão superficial, e vai fornecer condições de aderência ao peptidoglicano das bactérias Gram positivas e da membrana externa das Gram negativas, auxiliando no processo de formação do biofilme.

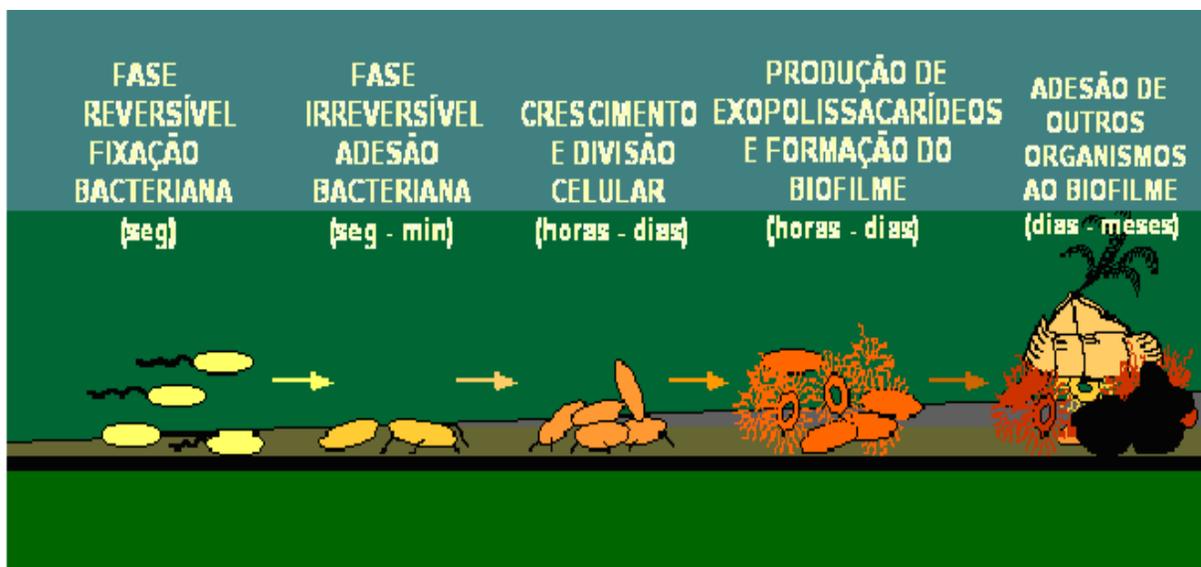


Figura 1. Mecanismo teórico da formação de biofilme bacteriano

Fonte: The Microbial World (2006)

Nota: Adaptado pela autora

Outro mecanismo é proposto por Zottola e Sasahara (1994), a adesão ocorre a partir da deposição dos microrganismos em uma superfície de contato,

seguido da fixação, interação com a superfície e início do crescimento, quando a massa celular atinge determinada concentração, a ela são agregados nutrientes, resíduos e outros microrganismos, formando-se o que se denomina de biofilme bacteriano.

Com o tempo o biofilme formado começa a se desfazer, o que possibilita a liberação de partículas relativamente grandes de biomassa no meio, podendo promover a contaminação dos alimentos em altos níveis (FORSYTHE, 2002).

Segundo Telgmann, Horn e Morgenroth (2004), o processo de erosão do biofilme consiste na liberação de organismos ou de pequenos fragmentos de biofilme, o que ocorre continuamente, já o desprendimento de grandes fragmentos de biofilme é um processo intermitente e aleatório.

Com o desprendimento de partículas do biofilme, as bactérias liberadas continuam mantendo as suas características genéticas de resistência, e como se tornam novamente planctônicas, poderão colonizar outras partes da superfície (CLONTZ, 2008).

A Figura 2 apresenta resumidamente as principais fases do processo de adesão e formação de biofilmes bacterianos.

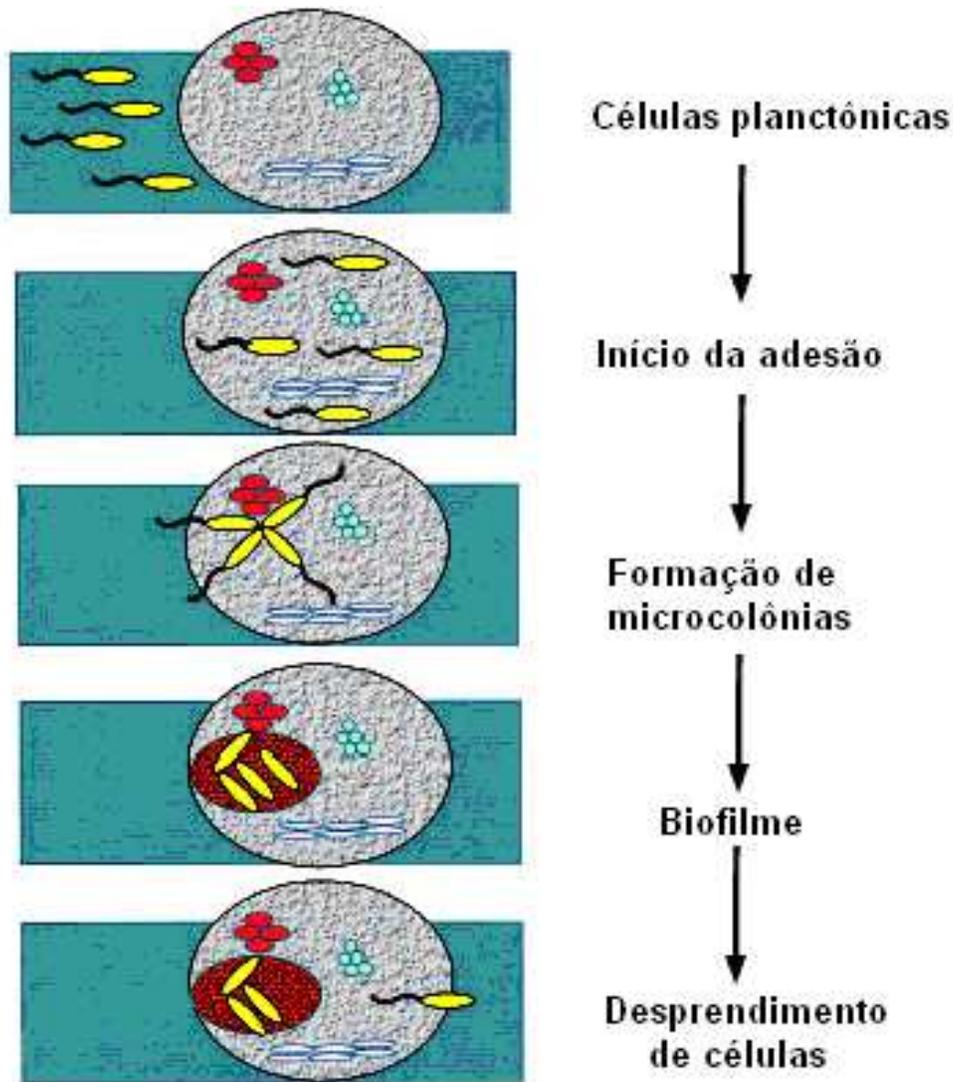


Figura 2. Esquema simplificado de formação de biofilmes bacterianos

Fonte: Watnick; Kolter (2000)

Nota: Adaptado pela autora

Após a formação do biofilme, as bactérias continuam se multiplicando, constituindo assim uma fonte potencial de contaminação aos alimentos, principalmente quando se trata da adesão de bactérias patogênicas (MOSTELLER; BISHOP, 1993).

Segundo Criado, Suárez e Ferreirós (1994), os biofilmes são constituídos por bactérias que primeiramente aderem às superfícies, que são então envolvidas por partículas de matéria orgânica, com formação de depósitos em que os microrganismos estarão fortemente aderidos à superfície por meio de filamentos

de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálix ou exopolissacarídeo. Estes biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, formando uma crosta, debaixo da qual os microrganismos continuam a crescer (MOSTELER; BISHOP, 1993). Mas a maior parte da estrutura é formada por água, que responde por cerca de 85% a 95% da massa total de um biofilme, além de serem as únicas estruturas capazes de permitir a coexistência de organismos aeróbios e anaeróbios estritos a poucas centenas de micrômetros um do outro (SCHNEIDER, 2007).

Os exopolissacarídeos podem aprisionar os nutrientes e fornecer proteção aos microrganismos presentes no biofilme formado. No entanto, a adesão de bactérias a superfícies não está condicionada a produção de exopolissacarídeos, visto que a adesão e conseqüente formação de biofilme podem ocorrer mesmo em ausência destes (HOOD; ZOTTOLA, 1997). Como no caso dos esporos que apesar de não produzirem exopolissacarídeos podem formar biofilmes em superfícies de processamento de alimentos.

Segundo Consterton et al. (1987), no biofilme a população microbiana pode ser formada por diversas espécies, já que é possível que o metabólito de uma espécie sirva de nutriente para a outra, em um tipo de associação.

Apenas em alguns casos na indústria de alimentos os biofilmes podem ser desejáveis, como por exemplo, nos biorreatores para produção de fermentados e na agregação em madeira para produção de vinagre (ANDRADE; MACÊDO, 1996). São utilizados também nas estações de tratamento de água, como filtros biológicos que ajudam na remoção de microrganismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica nos efluentes (CLONTZ, 2008).

As indústrias de alimentos devem estar preparadas para o controle e remoção caso ocorra à formação de biofilmes, no entanto devem atuar sempre de forma preventiva, com a utilização de práticas corretas de limpeza e sanitização das superfícies de contato (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

2.2.1 Fatores que influenciam na adesão e formação de biofilmes bacterianos

Vários fatores influenciam no processo de adesão e formação de biofilme bacteriano, segundo Zottola e Sasahara (1994) fatores como carga da superfície, hidrofobicidade, temperatura, presença de substratos e características do microrganismo como pili, fímbrias e flagelo são muito importantes. Bower, McGuire e Daeschel (1996) ressaltam ainda as diferenças entre as superfícies utilizadas e a configuração dos equipamentos em relação à facilidade ou não de limpeza e sanitização.

Existem ainda outros fatores relacionados à morfologia das superfícies que podem ser determinantes para a adesão, como sua composição, rugosidade e porosidade (PEREIRA et al., 2000).

Como os biofilmes são constituídos de agregados de células e a formação de sua estrutura tridimensional é um processo dinâmico que envolve vários eventos moleculares, estes se tornam um ambiente propício para a comunicação célula-célula, denominado *quorum sensing*. Neste sistema ocorre a produção de compostos sinalizadores pelas bactérias, pequenas moléculas denominadas de auto indutores, que irão modular e influenciar a formação do biofilme bacteriano, além de modular outras funções celulares como a esporulação, produção de bacteriocinas, expressão de fatores de virulência, produção de proteases e pigmentação de acordo com a densidade populacional (VIANA, 2006).

Bernardes (2008), concluiu que o aumento da temperatura de 4 °C para 35 °C, promoveu aumento do número de células de *Bacillus cereus* aderidas em mais de 3 ciclos log, e aumentando-se o tempo de adesão de 1 para 4 dias, a taxa de adesão aumentou em mais de 4 ciclos log, demonstrando a influência do tempo e temperatura no processo.

Careli (2005), em avaliação da adesão de *Pseudomonas fluorescens* em vários tipos de superfícies utilizadas na indústria de alimentos, concluíram que os resultados de adesão diferiram em relação ao tipo de superfície, as técnicas utilizadas e ao tempo de contato.

De acordo com Rosado et al. (2007) em avaliação da formação de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável, granito e mármore os fenômenos de adesão e de formação de biofilme são afetados pela temperatura de exposição, tempo de contato e tipos de superfícies.

Marques (2004) avaliou a formação de biofilme de várias cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de amostras clínicas, em vidro. As cepas foram classificadas em grupos de acordo com a taxa de adesão, variando de fracamente a fortemente formadoras de biofilme, e os resultados variaram de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^7$ UFC.cm⁻², demonstrando a grande capacidade de formação de biofilme pelo microrganismo e que variações podem ocorrer até dentro de uma mesma espécie isolada de diferentes amostras.

Em avaliação da adesão de *Pseudomonas fragi* em aço inoxidável em diferentes valores de pH, a taxa máxima de adesão observada foi na faixa de pH de 7,0 a 8,0, coincidindo com o pH ótimo para o metabolismo deste microrganismo (STONE; ZOTOLLA, 1985). O pH afeta ainda as propriedades superficiais dos microrganismos e das superfícies sólidas, interferindo no processo de adesão de formação de biofilme, já que pode aumentar ou diminuir a repulsão eletrostática entre as duas entidades (CHAVES, 2004).

A hidrofobicidade e a carga elétrica da superfície bacteriana são características físico-químicas que estão envolvidas na adesão de microrganismos em superfícies. Como a hidrofobicidade está relacionada a componentes hidrofóbicos presentes na membrana externa dos microrganismos, as interações poderão influenciar a adesão de microrganismos, seja em superfícies de processamento ou na própria superfície do alimento (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

O tipo de substrato também apresenta uma importante influência neste processo. Segundo Viana (2006) a formação de biofilme em superfície de poliestireno foi amplamente influenciada pelo tipo de meio de cultivo, sendo que os meios nutricionalmente mais ricos contendo compostos como triptona, peptona e extrato de levedura, foram os que propiciaram maior taxa de desenvolvimento bacteriano. Assim segundo Boari (2008), o leite é um substrato que pode

beneficiar o processo de adesão e formação de biofilmes, já que possui uma constituição rica em carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, além da alta atividade de água e pH próximo a neutralidade.

A participação de fatores físico-químicos na regulação da estrutura do biofilme deve ser analisada em associação com os fatores genotípicos, e assim a utilização da modelagem matemática, poderá contribuir em muito para os estudos, no sentido de explicar o ciclo de desenvolvimento do biofilme (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

2.2.2 Microrganismos envolvidos na formação de biofilmes

Existe uma grande variedade de microrganismos que podem estar relacionados com a formação de biofilmes. Esses microrganismos podem ser originários de várias fontes primárias de contaminação dentro da cadeia alimentar e seu envolvimento no processo de adesão e formação de biofilme em equipamentos e utensílios utilizados durante o processamento de alimentos pode ocorrer em vários níveis de intensidade e sua liberação poderá trazer conseqüências indesejáveis a qualidade do alimento, podendo alterá-lo ou mesmo torná-lo um veículo de patógenos (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Assim microrganismos deteriorantes e patogênicos capazes de aderir a superfícies de processamento podem originar problemas de ordem pública ou econômica.

Dentre os microrganismos alteradores se encontram *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus sp.* (CRIADO; SUÁREZ; FERREIRÓS, 1994), *Pseudomonas fluorescens* (ROSSONI; GAYLARDE, 2000; CARELI, 2005; ROSADO et al.; 2007), *Aeromonas hydrophila* (BOARI, 2008), *Enterococcus faecium* (ANDRADE; AJAO; ZOTTOLA, 1998; ANDRADE; BRIDEGMAN; ZOTTOLA, 1998; GELSOMINO et al., 2001, 2002), *Enterococcus faecalis* (GELSOMINO et al., 2001, 2002).

Entre as bactérias patogênicas podem-se citar *Salmonella typhimurium* (HOOD; ZOTTOLA, 1997), *Listeria monocytogenes* (HOOD; ZOTTOLA, 1997;

GRAM et al., 2007), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (POMPERMAYER et al., 2000), *Yersinia enterocolitica* (HOOD, 1996), e *Bacillus cereus* (FIGUEIREDO, 2000; BERNARDES, 2008).

Além das células vegetativas, os esporos bacterianos também podem participar dos processos de adesão e formação de biofilme, por estarem dispersos no ambiente, como solo, ar e água, podendo assim contaminar alimentos e superfícies, apresentando como importante característica a resistência ao tratamento térmico e aos agentes químicos empregados durante a higienização (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

2.2.2.1 *Enterococcus* e a formação de biofilmes na indústria de alimentos

Dentre os microrganismos capazes de aderir às superfícies utilizadas no processamento de alimentos, com possível formação de biofilme, estão as bactérias do gênero *Enterococcus*. Segundo Andrade, Bridgeman e Zottola (1998), estes microrganismos apresentam capacidade de aderência em aço inoxidável, e por serem freqüentemente encontrados no leite sendo denominadas bactérias ácido lácticas psicotróficas e termodúricas, a presença das mesmas implica na necessidade da utilização correta de baixas temperaturas de estocagem e um programa adequado de limpeza e sanitização.

Em estudo de Andrade, Ajao e Zottola (1998) sobre *Enterococcus faecium*, estes autores observaram que quando a contagem inicial do meio em contato com cupons teste de aço inoxidável era de 10^3 UFC.mL⁻¹, após 8 horas de incubação a 30 °C, a adesão foi de $3,2 \times 10^4$ UFC.mm⁻².

Gelsomino et al. (2002), em pesquisa realizada com queijo Cheddar sugerem que uma das fontes de *Enterococcus* no produto, seria os equipamentos de ordenha, já que as estipes encontradas nestes também foram encontradas no queijo. No estudo observaram ainda falhas nos procedimentos de higienização, uma vez que a contaminação microbiana permanecia nas fendas, junções, extremidades inoperantes e encaixes, podendo sobreviver e aderir, contaminando

assim diretamente o leite. A presença de *Enterococcus* mesmo após cloração foi atribuída à possível formação de biofilme.

Temelli et al. (2006) verificaram a presença de bactérias do gênero *Enterococcus* em superfícies de faca de corte, bandejas, agitador de leite, prensas, embalagens, assoalho, paredes e em mãos de manipuladores, durante o processamento de queijo, demonstrando novamente que a qualidade do produto final é função da taxa de contaminação dos equipamentos e utensílios de contato e de uma higienização eficiente, e ainda da capacidade de adesão de *Enterococcus* em tais superfícies.

2.2.3 Inativação de microrganismos aderidos em superfícies utilizadas na indústria de alimentos

Uma constante preocupação para as indústrias de alimentos é a avaliação dos procedimentos de higienização dos equipamentos e utensílios utilizados, e a necessidade de rápidos resultados como forma de garantir a qualidade dos produtos processados e a segurança dos consumidores (SIMM, 2006).

Logo após o processamento, os equipamentos e utensílios que entraram em contato com o alimento, irão apresentar uma elevada carga de resíduos como consequência da presença de carboidratos, gordura, proteína e minerais. Estes resíduos orgânicos e minerais são necessários ao crescimento de microrganismos contaminantes, e devem ser rapidamente removidos (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

Os procedimentos de higienização consistem no uso combinado de detergentes e sanitizantes, no qual os detergentes, embora diminuam a carga bacteriana das superfícies, tem como função principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais, enquanto a sanitização visa à redução dos microrganismos alteradores e a eliminação dos patogênicos a níveis seguros (MORAES, 1997).

Os equipamentos e utensílios a serem utilizados durante o processamento de alimentos devem ser desenhados e construídos de forma adequada, para que se possa assegurar a higiene e permitir à fácil e completa limpeza e sanitização.

Além disso, devem ser instalados de forma a permitir um fácil acesso e limpeza adequada, e ter sua utilização exclusiva aos fins que foram projetados (BRASIL, 1997).

Os processos de limpeza e sanitização de superfícies tornam-se mais difíceis e menos eficientes com a presença de microrganismos, sendo este um problema potencial, principalmente nos procedimentos de higienização de equipamentos que apresentem locais de difícil acesso aos sanitizantes, facilitando assim o processo de adesão (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

O uso correto de detergentes e sanitizantes geralmente eliminam os microrganismos aderidos aos equipamentos, no entanto procedimentos de higienização incorretos não removem e nem inativam estes microrganismos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). A não remoção de bactérias e sujidades favorece, portanto a adesão nos equipamentos e utensílios e assim os alimentos poderão ser contaminados (FIGUEIREDO, 2000).

Como a remoção dos biofilmes é extremamente difícil, sempre devem ser adotados métodos preventivos, e estes devem ter início desde o projeto da instalação da indústria e continuarem durante todas as etapas de produção (CLONTZ, 2008).

Segundo Gram et al. (2007), embora não esteja ainda completamente comprovado, acredita-se que com a utilização incorreta dos produtos de limpeza e desinfecção, determinadas espécies de microrganismos possam se adaptar, ou mesmo promover a seleção daqueles que são tolerantes a alguns dos produtos usados.

Os microrganismos que se encontram no interior dos biofilmes, devido a sua estrutura, são protegidos da remoção quando expostos ao escoamento de líquidos e a alta turbulência, além da proteção a ação de biocidas, como os utilizados nos procedimentos de higienização (CLONTZ, 2008).

A remoção de depósitos é fundamental para o controle e prevenção da formação de biofilmes bacterianos, segundo Zottola e Sasahara (1994), a presença de resíduos de alimentos nas superfícies dificulta a penetração dos sanitizantes, impedindo a efetiva eliminação dos microrganismos, além disso, o

sanitizante pode reagir com resíduos de proteínas, gordura e minerais, diminuindo sua atividade.

A sanitização finaliza o procedimento de higienização, e irá assegurar a qualidade microbiológica das superfícies, e esta deverá ser realizada, sempre que possível, logo antes do uso do equipamento, já que após as etapas de limpeza, os microrganismos sobreviventes poderão se multiplicar, ou mesmo a recontaminação ambiental pode levar a contaminação do alimento (ANDRADE, PINTO; ROSADO, 2008). Assim torna-se muito importante o conhecimento dos sanitizantes disponíveis, suas funções, formas de uso, concentrações recomendadas, formas de atuação, para a melhor escolha de acordo com a superfície (TROLLER, 1993).

Vários sanitizantes são utilizados na indústria de alimentos, como os compostos à base de cloro, iodo, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e quaternário de amônio, e devem ser aprovados através de testes laboratoriais, nas condições recomendadas pelos fabricantes (FIGUEIREDO, 2000).

A seleção de sanitizantes pode ser efetuada com base em testes laboratoriais, que incluem os testes de diluição de uso e de suspensão; em testes em uso, que incluem os testes do swab, da rinsagem e da placa de contato; e em testes de uso simulado, que consistem em simular as condições da indústria no laboratório, oferecendo informações mais próximas da realidade (OKAZAKI, 2003).

A ação dos sanitizantes pode ser afetada por características de superfície, pelo tempo e temperatura de contato, pela concentração de uso, pelos tipos de resíduos presentes nas superfícies, pH, propriedades físico-químicas da água, por substâncias inativadoras e pelo tipo e concentração de microrganismos contaminantes. Assim, para se selecionar um sanitizante é necessário verificar se apresentam características como serem aprovados pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura, apresentarem amplo espectro de ação antimicrobiana com capacidade de destruir rapidamente os microrganismos, serem estáveis sob as várias condições de uso e terem baixa toxicidade e corrosividade. No entanto, segundo os autores, não existe um único sanitizante

capaz de atender a todos esses requisitos, assim torna-se necessário conhecer as propriedades, vantagens e desvantagens de cada sanitizante, antes da seleção (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

2.2.3.1 Ácido peracético (APA)

O sanitizante ácido peracético é comercializado na forma de uma mistura em equilíbrio, constituída por ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante (FIGURA 3), sendo que a reação ocorre em presença de um ácido mineral como catalisador, geralmente o mais utilizado é o ácido sulfúrico (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

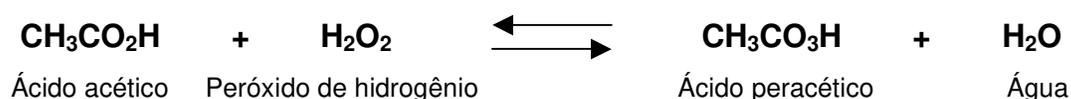


Figura 3. Reação de formação do ácido peracético

O ácido peracético é um sanitizante com amplo espectro de atividade antimicrobiana, e por isso é utilizado em muitas indústrias, como as de processamento de alimentos, bebidas, médica, farmacêutica, têxtil, de papel e no tratamento de esgotos domésticos (ALASRI et al., 1992).

Na indústria de alimentos é bastante utilizado nos procedimentos de limpeza e sanitização em concentrações que geralmente variam de 0,25 a 0,45%, e temperatura entre 7 e 40°C, já que quando submetido a temperaturas acima de 43°C pode ter reduzida a ação do sanitizante, como resultado de sua decomposição (TROLLER, 1993).

O mecanismo de ação deste sanitizante está relacionado à sua forte capacidade oxidante, promovendo a oxidação dos componentes celulares (ANDRADE, MACÊDO, 1996). E embora o peróxido de hidrogênio seja um forte agente oxidante, contribuindo para a ação do sanitizante, o principal agente antimicrobiano é o ácido peracético, apresentando atividade mesmo em baixas concentrações e contra amplo espectro de microrganismos (KITIS, 2004).

Dentre os aspectos positivos apresenta características como à excelente ação sanitizante contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus e esporos, age em baixas temperaturas, permanece ativo em presença de matéria orgânica, não são afetados pela dureza da água (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008), não produz compostos tóxicos ou carcinogênicos, já que não reage com as proteínas dos alimentos e apresenta baixo impacto ambiental (ROSSONI; GAYLARDE, 2000). No entanto, pode ser corrosivo ao aço inoxidável, possui baixa estabilidade ao armazenamento, são irritantes à pele e às mucosas, por isso na forma concentrada, deverá ser manuseado de forma adequada, com utilização de equipamentos de proteção individual pelos manipuladores (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

Para Holah et al. (1990) o ácido peracético pode ser relatado dentre os sanitizantes, como o mais efetivo contra biofilmes.

Marques et al. (2007), obtiveram redução de 5,26 e 4,5 ciclo log da contagem inicial do biofilme de *Staphylococcus aureus*, para superfícies de aço inoxidável e vidro respectivamente, utilizando como sanitizante o ácido peracético na concentração de 500 mg. L⁻¹. Na pesquisa observaram que dentre os sanitizantes dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético, este último foi o mais efetivo na remoção das células aderidas.

2.2.3.2 Hipoclorito de sódio

A utilização de compostos clorados, como o hipoclorito de sódio, cloro gás, hipoclorito de cálcio, cloraminas orgânicas e dióxido de cloro, tem contribuído para o controle de doenças de origem hídrica e também para controle de toxinfecções alimentares causadas por microrganismos (ANDRADE, MACÊDO, 1996).

Esses compostos podem ser classificados em inorgânicos, incluindo neste grupo o cloro gás (Cl₂), o hipoclorito de sódio (NaClO), o hipoclorito de cálcio (CaClO₂) e o dióxido de cloro (ClO₂), e orgânicos conhecidos como cloraminas orgânicas e que são produzidas pela reação do ácido hipocloroso (HClO) com aminas, iminas, amidas e imidas (ANDRADE, PINTO; ROSADO, 2008).

O cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, é o composto mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica e aumentar a segurança e a vida útil de alimentos processados (NASCIMENTO et al., 2005; SREBERNICH, 2007). Na indústria de alimentos são utilizados no processo de desinfecção de águas, de superfícies dos alimentos, tubulações, equipamentos, ambientes, pisos e paredes (MACÊDO et al., 1999).

Comercializado na forma líquida, com concentrações variando de 2 a 10% de cloro residual total, expresso em Cl₂, este sanitizante apresenta várias vantagens, como custo, rápida ação, não serem afetados pela dureza da água, efetivos contra ampla escala de microrganismos, incluindo os esporos, efetivos em baixas concentrações, relativamente não tóxicos nas condições de uso e de fácil aplicação. No entanto podem apresentar também desvantagens como o fato de serem inativados pela matéria orgânica, podem ser corrosivos dependendo da concentração, causam irritação a pele, apresentam menor eficiência a pH elevado, e podem causar a oxidação de borrachas utilizadas nos equipamentos (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

O hipoclorito de sódio, assim como a maioria dos compostos clorados, quando em solução aquosa, libera o ácido hipocloroso em sua forma não dissociada (FIGURA 4), sendo este o responsável pela ação antimicrobiana do sanitizante. Esta é uma reação muito influenciada pelo pH, já que este é determinante na quantidade de ácido hipocloroso em solução (TROLLER, 1993).

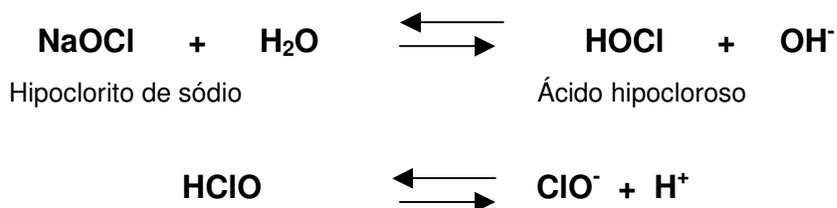


Figura 4. Reação de dissociação do hipoclorito de sódio em solução aquosa

Segundo Estrela et al. (2002), a ação sanitizante do hipoclorito de sódio esta relacionada à sua capacidade de promover alterações celulares biossintéticas, além de alterações no metabolismo celular e causar a destruição de fosfolipídios, devido a formação de cloraminas que interferem no metabolismo

celular, a sua ação oxidante, que causa ainda a inibição enzimática irreversível nas bactérias, e pela capacidade de degradação de ácidos graxos e lipídeos.

A utilização de hipoclorito de sódio após a etapa de limpeza, no processo de higienização foi suficiente para reduzir a contagem de *Streptococcus thermophilus* aderido a superfície de aço inoxidável a níveis não detectados (GÂNDARA, OLIVEIRA, 2000).

Em outra pesquisa, o hipoclorito de sódio (100 mg.L^{-1} e 200 mg.L^{-1}) foi mais eficiente em comparação ao ácido peracético (250 mg.L^{-1} e 1000 mg.L^{-1}), nas duas concentrações, no controle dos microorganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* aderidos a superfície de aço inoxidável (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

DeQueiroz e Day (2007), obtiveram uma redução de 3 e 4 ciclos log após 1 minuto de contato e de 4 e 6 ciclos log após 5 minutos, para superfície de alumínio e aço inoxidável respectivamente, utilizando uma concentração que variou entre 100 mg.L^{-1} a 130 mg.L^{-1} de hipoclorito de sódio, no controle de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 19142.

2.3 Superfícies utilizadas na indústria de alimentos

Todo equipamento e utensílio a ser utilizado em locais de manipulação de alimentos, e que possam de alguma forma entrar em contato com o alimento devem ser confeccionados de material que não transmitam substâncias tóxicas, odores e sabores, ser resistentes a corrosão e capazes de resistir às operações de limpeza e sanitização. Além disso, as superfícies devem ser lisas, estarem isentas de rugosidade, frestas e quaisquer outras imperfeições que possam comprometer a higiene dos alimentos, ou mesmo ser fonte de contaminação. Assim a utilização de materiais como a madeira ou outros em que a limpeza e sanitização não possam ser realizadas de forma adequada, deve ser evitada, a menos que se tenha a certeza de que seu uso não será fonte de contaminação. A utilização de diferentes materiais também deve ser evitada sempre que possível, de forma a evitar a corrosão por contato (BRASIL, 1997).

Existe uma grande diversidade de materiais utilizados para comporem estas superfícies, assim além do aço inoxidável que é a superfície considerada como convencional e de fácil higienização, outros materiais como vidro, borracha, polietileno, polipropileno, poliuretano, policarbonato, teflon, mármore, granito, entre outros, são usados e apresentam características particulares (TABELA 1) (CARELI, 2005).

As várias superfícies utilizadas nas indústrias de alimentos diferem em suas microtopografias, e muitas podem apresentar fendas ou fissuras em tamanhos suficientes para alojar microrganismos, e assim protegê-los dos procedimentos de higienização por serem regiões de difícil acesso (BOWER, McGUIRE, DAESCHEL, 1996).

Este fator se agrava considerando-se que freqüentemente as superfícies entram em contato com alimentos líquidos ou sólidos e que carregam microrganismos (OULAHAL, 2008). Haeghebaert et al. (2002) demonstraram que a contaminação de equipamentos foi responsável por 59% dos surtos de doenças de origem alimentar na França, durante o ano de 2001. Em 1997 esse valor era de 37% (HAEGHEBAERT et al., 1998). Para Andrade et al. (2008), equipamentos e utensílios contaminados respondem por 16% dos principais surtos de origem alimentar.

Segundo Flint et al. (2000), uma superfície rugosa pode ser preferencialmente colonizada por proporcionar aos microrganismos locais de proteção do estresse do ambiente, da turbulência do líquido que envolve a superfície e da atividade dos biocidas.

A influência da rugosidade da superfície na formação de biofilmes bacterianos está diretamente relacionada a dificuldades nos procedimentos de limpeza de uma superfície rugosa, sendo necessário métodos mais eficientes (HOOD; ZOTTOLA, 1997).

TABELA 1. Características dos principais tipos de superfícies utilizadas na indústria de alimentos

Superfícies	Características	Cuidados
Aço inoxidável	Geralmente resistente à corrosão; superfície lisa e impermeável; resistente à oxidação às altas temperaturas; fácil higienização	Certas ligas podem ser corroídas por halogênios
Aço carbono	Detergentes ácidos e alcalinos causam corrosão	Devem ser galvanizados ou estanhados. Usar detergente neutro no procedimento de higienização
Estanho	Corroído por alcalinos e ácidos	Superfícies estanhadas não devem entrar em contato com alimentos
Concreto	Danificado por alimentos ácidos e agentes de limpeza	Deve ser denso e resistente aos ácidos
Vidro	Liso impermeável. Danificado por alcalinos fortes e outros agentes de limpeza	Deve ser limpo com detergentes neutros ou de média alcalinidade
Tinta	Depende da técnica de aplicação. Danificado por agentes alcalinos fortes	Somente algumas tintas são adequadas à indústria de alimentos
Borracha	Não deve ser porosa, não esponjosa. Não ser afetado por agentes alcalinos fortes. Não ser afetada por solventes orgânicos e ácidos fortes	Pode se oxidar por agentes de limpeza
Madeira	Permeável à umidade, gordura e óleo. Difícil manutenção. É destruída por alcalinos fortes	Difícil higienizar

Fonte: Andrade; Pinto; Lima (2008)

A facilidade de higienização de superfícies, e suas propriedades anticorrosivas são fatores decisivos na escolha de materiais para equipamentos da linha de processamento. O aço inoxidável é o material freqüentemente utilizado em equipamentos e utensílios na indústria de alimentos, como tanques, trocadores de calor, silos, tachos, mesas, pias, bancadas e tubulações, e constitui um importante exemplo de superfície considerada de fácil higienização e de alta resistência a corrosão provocada por alimentos e detergentes (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; JULLIEN et al., 2002).

O aço inoxidável é composto por uma liga de carbono, cromo e níquel, e a variação das porcentagens destes elementos é que determinará a classificação. Assim o grupo contendo 18% de cromo e 8% de níquel são os mais utilizados, como as ligas da classe 300 que compreendem o 304 e 316, e que apresentam boa resistência à corrosão causada pelos próprios alimentos, detergentes e sanitizantes, são facilmente higienizadas, e relativamente baratos, satisfazendo assim a maioria das necessidades da indústria de alimentos. O 316 é mais utilizado em situações onde o processo corrosivo pode ser mais intenso, como por exemplo, em salmouras e alimentos muito ácidos, por conter mais níquel (10%) e molibdênio (2-3%) (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

2.4 Utilização de microscopia para avaliação da formação de biofilme

A demanda por tecnologias que possam fornecer uma rápida quantificação de microrganismos cresceu muito nos últimos anos, levando a avaliação de novos métodos que incluem a microscopia, microbiologia molecular e bioluminescência. No entanto as técnicas apresentam algumas limitações como seletividade, sensibilidade, custo, reprodutividade, além da dificuldade de quantificação das bactérias aderidas, principalmente quando na forma de biofilmes (CARELI, 2005).

As técnicas microscópicas são as mais recomendadas para a visualização da adesão e formação de biofilmes bacterianos em superfícies de processamento de alimentos, permitindo o acompanhamento do desenvolvimento do biofilme em tempo real (PARIZZI et al., 2004).

Vários métodos microscópicos podem ser utilizados para a avaliação do processo de adesão, como a microscopia ótica, de contraste de fase, a confocal, de epifluorescência e a eletrônica de varredura e de transmissão. As técnicas de microscopia eletrônica são as mais indicadas em análises em que se deseja avaliar a interação microbiana na matriz do biofilme. Nesta técnica, geralmente as amostras são fixadas pela utilização de agentes químicos como o glutaraldeído, o paraformaldeído e o ósmio (ZOTTOLA, 1997).

A partir da microscopia eletrônica de varredura é possível a visualização do desenvolvimento de um biofilme bacteriano sobre um suporte sólido, como por exemplo, vidro, aço inoxidável e borracha (ZOTTOLA, 1997), permitindo assim a análise das condições higiênicas das superfícies utilizadas nas indústrias de processamento de alimentos.

Rosado et al. (2007) avaliaram a adesão de *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável AISI 304 (American Iron and Steel Institute) através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 5), a contagem média foi de $1,3 \times 10^6$ UFC.cm⁻², muito próxima a obtida por contagem padrão em placas que foi de $1,6 \times 10^6$ UFC.cm⁻².

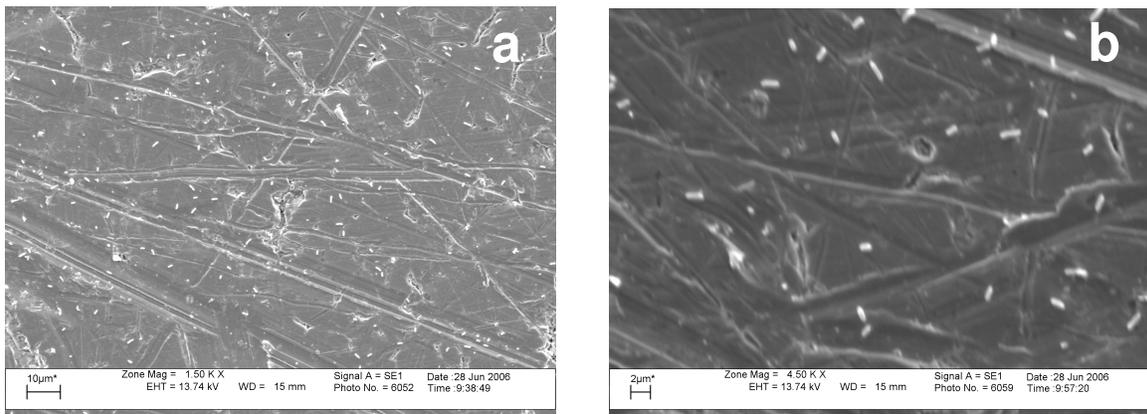


Figura 5. Fotomicrografia observada por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304, submetida ao processo de adesão por *Pseudomonas fluorescens* a 25 °C por 5 dias, nos aumentos a) 1500 x, b) 4000 x

Schneider (2007) utilizou a microscopia eletrônica de varredura para o acompanhamento das fases de desenvolvimento de biofilme em superfície de equipamento osmose reversa, tendo detectado também o início da produção de exopolissacarídeos. Surdeau et al. (2006) também utilizaram a microscopia eletrônica de varredura para visualização da produção de exopolissacarídeos em biofilme de *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Hoje as técnicas se aplicam a diferentes fases, tornando possível a avaliação desde a topografia da superfície, início da adesão, formação das camadas bacterianas constituindo a agregação, estabelecimento do biofilme, liberação de células do biofilme formado, permitindo até mesmo o estudo da influência da presença de fimbrias e produção de exopolissacarídeos na formação do biofilme, e ação de agentes sanitizantes, desde que seja escolhida uma técnica de microscopia adequada para cada caso (VANETTI et al., 2008).

2.5 Microbiologia preditiva

A habilidade de prever o crescimento microbiano em alimentos, para garantia da segurança alimentar e vida de prateleira, ainda é bastante limitada. Dentre os fatores que afetam o desenvolvimento microbiano o pH, a atividade de água, a temperatura, e a atmosfera estão entre os principais (FORSYTHE, 2005).

A utilização de modelos matemáticos em microbiologia de alimentos teve início na década de 20, com a elaboração de métodos para cálculo do tempo de destruição térmica de microrganismos na indústria de enlatados (ROSS; McMEEKIN, 1994).

A microbiologia preditiva combina os conhecimentos da microbiologia, com a matemática como forma de desenvolver modelos que não só descrevam, mas que também predigam o comportamento de microrganismos em relação às condições ambientais que se encontram (WHITING, 1995; MARKS, 2008). Assim torna-se possível descrever matematicamente o desenvolvimento de microrganismos submetidos a condições de crescimento prescritas (FORSYTHE, 2005).

Segundo McMeekin et al. (2002), a microbiologia preditiva pode ser conceituada como um conhecimento detalhado do desenvolvimento microbiano, em relação a condições ambientais, com o objetivo de avaliar o efeito do processamento, distribuição e armazenamento de alimentos, sobre a qualidade e segurança alimentar.

A microbiologia preditiva se fundamenta na premissa de que é possível reproduzir as respostas do comportamento de populações de microrganismos, oferecendo assim várias vantagens para o entendimento da microbiologia alimentar, o que explica o atual e crescente interesse dos pesquisadores por esta área (ROSS; McMEEKIN, 1994).

O interesse na modelagem surgiu da preocupação com microrganismos veiculados por alimentos, desenvolvendo-se modelos de crescimento de patógenos em diferentes alimentos (PEÑA, 2005). E atualmente a modelagem microbiana preditiva tem sido aplicada em vários setores, como em pesquisa e desenvolvimento de produtos, estudos da vida de prateleira e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FORSYTHE, 2005).

Várias pesquisas têm demonstrado a influência da temperatura de exposição e do tempo de contato sobre o processo de adesão bacteriana e formação de biofilmes, o que aumenta a necessidade de formulação de modelos matemáticos para avaliar os efeitos desses fatores e suas interações neste processo (ROSADO et al., 2008). A metodologia de superfície resposta é usada para otimizar e modelar operações de processamento de alimentos (FLOROS et al., 1992), podendo ser bem utilizada também para a melhor elucidação do processo de adesão e formação de biofilme bacteriano e como auxílio na tomada de decisões em relação aos procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos (PEÑA, 2005).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo consiste em avaliar as características tecnológicas de *Enterococcus faecium*, isolado de queijo de coalho, a possível formação de biofilme em superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento nº 4, utilizada nas indústrias de alimentos e seu controle por agentes sanitizantes.

Como objetivos específicos estão:

- ✓ Avaliar a capacidade da estirpe de *Enterococcus faecium*, em conferir ao queijo características tecnológicas desejáveis;
- ✓ Modelar a formação de biofilme de *Enterococcus faecium*, avaliando a influência do tempo de contato e temperatura de exposição no processo.
- ✓ Avaliar a resistência do biofilme formado aos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético, freqüentemente utilizados na indústria de alimentos;
- ✓ Fornecer ferramentas à indústria de laticínios para o controle do processo de adesão e formação de biofilmes bacterianos por *Enterococcus faecium* em superfícies de equipamentos e utensílios compostos por aço inoxidável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Higiene e Legislação do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia, ambos da Universidade Estadual de Campinas.

4.1 Microrganismos e meios de cultura utilizados

Uma cultura de *Enterococcus faecium*, previamente isolada de queijo tipo coalho, codificada como 946Ec, identificada como não patogênica e mantida em leite tornassolado por Carvalho (2007) foi utilizada. previamente isolada de queijo tipo coalho,

A cultura foi ativada por duas vezes consecutivas em caldo MRS *Lactobacilli* (Oxoid) a 35 ± 1 °C por 24 horas, e mantida a -80 °C neste mesmo meio em tubos Eppendorf de 1mL contendo 10% de glicerol (Quimis).

Para os estudos de formação de biofilme, a cada ensaio a cultura foi ativada e repicada por duas vezes consecutivas em 10 mL de caldo MRS a 35 ± 1 °C por 24 horas.

4.2 Caracterização tecnológica

Pelo fato da cultura de *Enterococcus faecium* ser proveniente de queijo tipo coalho esta foi testada para as seguintes características tecnológicas:

4.2.1 Atividade em leite tornassolado

A cultura teste de *Enterococcus faecium* foi inoculada em leite tornassolado e incubada a 35 ± 1 °C para avaliação do seu desenvolvimento durante 14 dias (HARRIGAN, 1998). Para visualização e interpretação dos resultados, os tubos

foram fotografados a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14 dias. O mesmo ensaio foi realizado com cultura de *Enterococcus faecium* ATCC 6569, cedida pela Fundação André Tosello, para comparação dos resultados.

A interpretação dos resultados foi realizada segundo Harrigan (1998), de acordo com as seguintes características:

❖ Reações envolvendo a lactose:

- Mudança de cor do meio para rosa devido à produção de ácido;
- Formação de coágulo, devido à produção de ácido;
- Redução do tornassol resultando em perda de cor, o que geralmente precede outras alterações;
- Produção de gás, geralmente visível como pequenas bolhas no coágulo formado.

❖ Reações envolvendo a caseína:

- Coagulação do leite como resultado da atividade proteolítica enzimática, que irá afetar a caseína, podendo aparecer uma coloração azul;
- Hidrolise da caseína, como resultado da atividade proteolítica enzimática, promovendo a clarificação do meio e deixando-o opaco, o que geralmente ocorre pela peptonização, podendo ocorrer uma cor marrom claro.

❖ Reações envolvendo outros constituintes do leite:

- Utilização do citrato presente no leite, resultado de uma reação alcalina que pode ser observada por uma forte cor azul.

4.2.2 Capacidade acidificante

Para determinação da curva de pH de *Enterococcus faecium*, foi retirada uma alçada da cultura congelada (item 4.1) para ativação em 10 mL de caldo MRS, seguido de incubação a 35 ± 1 °C por 24 horas.

Após este período, uma alçada da cultura ativa foi retirada para repicagem em 50 mL de caldo MRS incubado a 35 ± 1 °C por 24 horas. Este procedimento foi realizado por duas vezes consecutivas.

A cultura ativa foi centrifugada (Centrífuga Beckman J2-21) a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 mL de água peptonada (Difco) a 0,1%. Este procedimento foi repetido por três vezes consecutivas.

Sucessivas diluições decimais foram realizadas para inoculação de 10^4 UFC.cm⁻² em 100 mL de caldo MRS e 100 mL de leite desnatado reconstituído (a 10% v/v) seguido de incubação a 35 ± 1 °C para início da observação da curva de acidificação nestes meios.

Os valores de pH foram mensurados através de pHmetro (HANNA instruments modelo HI-9110) após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 24 e 48 horas de incubação. O tempo zero corresponde a medida do pH imediatamente após inoculação.

Os resultados experimentais foram avaliados, mediante o uso do software DMFit, através do modelo de Baranyi e Roberts (1995).

4.2.3 Produção de diacetil

A avaliação da produção de diacetil foi realizada a partir do método de Barrit, em três repetições, que consiste na adição, em um tubo de ensaio, de 1 mL de álcool etílico, 0,2 mL de NaOH 40%, 0,6 mL de α -naftol 5% em solução alcoólica e 1 mL da cultura teste. A presença de diacetil é detectada pela formação de um halo de coloração avermelhada na parte superior da solução, no intervalo de 10 a 60 minutos à temperatura de 22 a 37 °C (KUNZ, 1986).

4.3 Contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* no leite cru

A contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* no leite cru foi realizada em três repetições, com o objetivo de conhecer a concentração do inóculo inicial para avaliação da formação de biofilme.

Diluições decimais em série das amostras de leite cru foram realizadas em água peptonada a 0,1%, seguido de plaqueamento em superfície, em meio

diferencial ágar KF *Streptococcus* (Himedia), acrescido de TTC a 1% (Cloreto de 2, 3, 5 Trifeniltetrazolio) e incubação a 45 ± 1 °C por 48 horas para inibir possíveis microrganismos acompanhantes (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 1992).

Oito colônias típicas de cada placa foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para Caldo Cérebro Coração (BHI), incubadas a 35 °C por 24 horas, e posteriormente submetidas aos testes de confirmação: coloração de Gram, catalase, capacidade de crescimento em ágar Bile Esculina, em BHI contendo NaCl 6,5%, em BHI com pH 9,6 e em BHI incubado a 10°C (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 1992).

A contagem de colônias foi realizada considerando-se as características morfológicas esperadas e confirmadas pelos testes: presença de colônias vermelhas pela redução de TTC a formazan, rodeadas por halo amarelo devido à formação de ácido detectado pelo indicador bromocresol púrpura. As colônias foram comparadas as obtidas pelo plaqueamento nas mesmas condições da cultura de *Enterococcus faecium* ATCC 6569.

4.4 Curva de crescimento

Para determinação da curva de crescimento de *Enterococcus faecium*, foi retirada uma alçada da cultura congelada (item 4.2) para ativação em 10 mL de caldo MRS, seguido de incubação a 35 ± 1 °C por 24 horas.

Após este período, uma alçada da cultura ativa foi retirada para repicagem em 50 mL de caldo MRS incubado a 35 ± 1 °C por 24 horas. Este procedimento foi realizado por duas vezes consecutivas.

A cultura ativa foi centrifugada (Centrífuga Beckman J2-21) a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e a cultura ressuspensa em 10 mL de água peptonada a 0,1%. Este procedimento foi repetido por três vezes consecutivas.

O precipitado foi ressuspensa em 10 mL de água peptonada 0,1%, e realizadas sucessivas diluições decimais para inoculação de 10^4 UFC.cm⁻² em 100 mL de caldo MRS e início da curva a temperatura de 35 ± 1 °C.

O intervalo de análise variou de 0 a 24 horas. O tempo zero corresponde à contagem imediatamente após inoculação. A cada tempo foram realizadas diluições adequadas em água peptonada 0,1% e plaqueamento em profundidade em Ágar Padrão para Contagens (PCA – Oxoid), seguido de incubação a 35 ± 1 °C por 48 horas.

Foram realizadas três repetições e a média dos resultados experimentais avaliados, mediante o uso do software DMFit, através do modelo de Baranyi e Roberts (1995) de acordo com a equação:

$$y(t) = y_0 + (\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)} - 1}{e^{y_{\text{máx}} \cdot y_0}}\right)$$

Onde: $y(t)$ = ln da concentração celular

$\mu_{\text{máx}}$ = velocidade máxima de crescimento

x = concentração celular

$y_0 = \ln x_0$; $y_{\text{máx}} = \ln x_{\text{máx}}$

$A(t)$ = função do ajuste

4.5 Avaliação da formação de biofilmes

4.5.1 Superfícies utilizadas

Para avaliar a formação de biofilme bacteriano, foi adquirida uma chapa de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, nas dimensões de 1 x 1,20 m (AÇOMEDI - INOX E METAIS), material este selecionado por ser amplamente utilizado na construção de equipamentos, bancadas e utensílios das indústrias de alimentos em geral.

A chapa foi transportada protegida de forma a evitar danos ao material, e o corte em cupons de 1 x 1 cm, foi realizado pelo Centro de Tecnologia da Unicamp, em cortador especial para permitir a uniformidade do material nas laterais.

A determinação da rugosidade do material também foi realizada pelo Centro de Tecnologia da Unicamp, Laboratório de Metrologia, utilizando-se

rugosímetro modelo S8P, fabricante Perthen, e padrão de amplificação vertical, fabricante Hallr GmbH. O resultado para a análise de rugosidade foi obtido a partir de uma média de nove medições e temperatura de 20 ± 1 °C.

4.5.2 Determinação da formação do biofilme bacteriano

Antes de cada ensaio, os cupons foram limpos por escovação usando-se esponja, água destilada e detergente neutro líquido, e após este processo rinsados com água destilada e imersos em álcool etílico 70% por 1 hora visando à remoção da gordura, seguido da rinsagem com água destilada, secagem ao ar e esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos (PARIZZI, 2004).

Os cupons teste foram imersos assepticamente em erlenmeyer de 200 mL, contendo 100 mL de caldo MRS acrescido de um volume de suspensão de *Enterococcus faecium* para uma contagem inicial de 1×10^4 UFC.mL⁻¹.

A formação do biofilme bacteriano foi avaliada nas temperaturas de 4,5; 10,5; 25; 39,5 e 45,5 °C, com variação de ± 1 °C, e nos tempos de contato de 0; 1,2; 4; 6,8; e 8 dias, com variação de ± 1 hora com exceção ao tempo zero que corresponde ao ensaio realizado imediatamente após a imersão dos cupons no frasco contendo o meio de cultura e a suspensão bacteriana. Foram quantificadas as unidades formadoras de colônias por cm².

A cada tempo de contato os cupons foram retirados do caldo MRS para avaliação da contagem padrão em placa. A cada 48 horas de contato os cupons incubados foram imersos em um novo caldo MRS inoculado com aproximadamente 1×10^4 UFC.mL⁻¹ para manter a concentração no meio e foi realizada a contagem padrão em placa do caldo a ser descartado para controle.

A relação entre temperatura e tempo de contato foi avaliada de acordo com um delineamento composto central rotacional para dois fatores (tempo de contato e temperatura de exposição) proposto por Rodrigues e Lemma (2005), apresentado na Tabela 2. As respostas (UFC.cm⁻²) foram ajustadas por regressão utilizando o modelo polinomial quadrático ($\log \text{UFC.cm}^{-2} = b_0 + b_1T + b_2 T^2 + b_3t + b_4t^2 + b_5Tt$), em que b_0 até b_5 são os coeficientes do modelo, T é temperatura e t é o tempo de contato.

Tabela 2. Delineamento composto central rotacional para relação entre as variáveis tempo de contato e temperatura de exposição

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (dias)
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

A codificação é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Codificação das variáveis do delineamento composto central rotacional

Codificação das variáveis					
	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	4,5	10,5	25	39,5	45,5
Tempo (dias)	0	1,2	4	6,8	8

A menor temperatura utilizada foi 4,5 °C, devido ao fato das bactérias do gênero *Enterococcus serem* psicrótróficos, sendo, portanto capazes de crescer a temperaturas de refrigeração. Segundo Giraffa (2003) a presença de bactérias do gênero *Enterococcus* em queijos se deve principalmente a sua capacidade de crescimento em ampla faixa de temperatura, o que justifica a utilização de temperaturas neste modelo até 45,5 °C. A temperatura central deve ser aquela que pela literatura, certamente haverá o crescimento do microrganismo. Em relação aos tempos de contato estabelecidos, o tempo zero foi determinado como um controle, variando até oito dias por se tratar da avaliação da formação de um biofilme.

Estabelecendo-se a faixa de tempo de contato e temperatura de exposição com base nas características do microrganismo e tipo de experimento, os valores são calculados pelo modelo e a relação entre eles é apresentada na Tabela 4. Foram realizadas três repetições de cada ensaio.

Tabela 4. Relação entre temperatura de exposição e tempo de contato

TEMPERATURA (°C)	TEMPO (dias)
4,5	4
10,5	1,2 6,8
25	0 4 4 4 8
39,5	1,2 6,8
45,5	4

4.5.3 Determinação do número de células aderidas

4.5.3.1 Contagem padrão em placas (CPP)

A avaliação da adesão e formação de biofilme de *Enterococcus faecium* foi realizada pela técnica de contagem padrão em placas (CPP). Depois de incubados nos tempos e temperaturas determinados, cada cupom foi retirado do caldo MRS e imerso em 10 mL de solução peptonada 0,1% por um minuto, sem agitação, visando à remoção de células planctônicas. Em seguida, foi imerso em 5 mL da mesma solução e submetidos a vórtex (Fanem Modelo 251, velocidade 10) por dois minutos para remoção das células sésseis. Foram preparadas as diluições para plaqueamento por profundidade em Ágar Padrão de Contagem (PCA), seguido de incubação a 35 ± 1 °C por 48 horas (ANDRADE; AJÃO; ZOTTOLA, 1998). O mesmo procedimento foi realizado sem a adição do inóculo no meio, para controle.

4.5.4 Análise estatística dos resultados

A análise dos resultados foi avaliada utilizando-se o modelo polinomial quadrático ($\log \text{UFC.cm}^{-2} = b_0 + b_1T + b_2 T^2 + b_3t + b_4t^2 + b_5Tt$), em que b_0 até b_5 são os coeficientes do modelo e T é temperatura e t é o tempo (RODRIGUES, IEMMA, 2005).

4.5.5 Verificação experimental do modelo encontrado

Para verificação do modelo encontrado, foram conduzidos ensaios experimentais em três repetições, em condições não avaliadas anteriormente, como forma de testar a eficiência do modelo. Para isso foi realizado o mesmo procedimento de preparo e incubação dos cupons teste (item 4.5.2), na temperatura de 18 ± 1 °C pelos tempos de 2, 4 e 6 dias de contato com variação de ± 1 hora, e na temperatura de 35 ± 1 °C pelos tempos de 4 e 5 dias de contato com variação de ± 1 hora.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliação visual da formação de biofilme bacteriano nas superfícies dos cupons foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, visando verificar a topografia das superfícies e a adesão bacteriana.

Para avaliação da adesão bacteriana, dois cupons-teste de cada tratamento foram incubados de acordo com os tempos e temperaturas relacionados (item 4.5.2) 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 0,1M, com imersão dos cupons por 3 horas. 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. Os cupons 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. Os cupons foram então observados no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM – 5800 LV, em vários aumentos que variaram de 800 a 8000 vezes.

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

4.7 Avaliação da eficiência dos sanitizantes

Para avaliar a eficiência de sanitizantes em relação ao biofilme formado de *Enterococcus faecium*, foram utilizadas as soluções de hipoclorito de sódio (Super Cândida, Indústria Anhembi S.A.) a 100 mg.L^{-1} de Cloro Residual Total (CRT), pH=9,4 e de ácido peracético (Divovan Forte, Johnson Diversey) a 300 mg.L^{-1} de Ácido Peracético (APA), pH=2,8. Para o preparo das concentrações foi utilizada água destilada estéril. A solução clorada foi preparada e analisada de acordo com a metodologia da American Public Health Association – APHA (1985) e a de ácido peracético de acordo a indicação do fabricante (JOHNSONDIVERSEY, 2002).

Para cada sanitizante foram utilizados 60 cupons de aço inoxidável, para que se pudesse comparar ao método de diluição de uso, que é o padrão para avaliação da adesão bacteriana em superfície de aço inoxidável.

Os cupons de aço inoxidável foram imersos, assepticamente, em erlenmeyer de 200 mL, contendo 100 mL de caldo MRS acrescido de um volume de suspensão de *Enterococcus faecium*, para uma contagem final de 1×10^4 UFC.mL⁻¹, e incubados a $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ / $48 \pm 1 \text{ h}$, por ser a temperatura ótima de crescimento deste microrganismo. Cada erlenmeyer recebeu 10 cupons para análise e 1 para controle, num total de 6 ensaios para cada sanitizante. O cupom

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 por 10 minutos a temperatura ambiente, em torno de 25 °C. 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.

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 em Ágar Padrão de Contagem (PCA), seguido de incubação a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 h.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização tecnológica

A presença de bactérias do gênero *Enterococcus* em queijos é hoje assunto de muita discussão, pois apesar de existirem estirpes relacionadas a enfermidades humanas, outras foram identificadas como não patogênicas e capazes de conferir aos queijos características tecnológicas desejáveis e muitas vezes determinantes para sua aceitabilidade.

Assim estirpes específicas de *Enterococcus* são freqüentemente relatadas por apresentarem capacidade de acidificação e produção de sabor e aroma característicos de alguns queijos. No entanto estas são características variáveis e dependentes da estirpe e do meio em que se encontra.

5.1.1 Atividade em leite tornassolado

As reações em leite tornassolado podem ser utilizadas para caracterização de culturas láticas. A fermentação da lactose com produção de ácido e a proteólise devido a enzimas sintetizadas pelos microrganismos podem ser identificadas por alteração de cor e formação de coágulo no meio.

Assim as transformações no meio devido às reações que ocorreram durante a incubação a 35 °C por período de até 14 dias, podem ser visualizadas pelas Figuras 6 e 7, que correspondem à cultura de *Enterococcus faecium* isolado de queijo de coalho e *Enterococcus faecium* ATCC 6569 respectivamente.

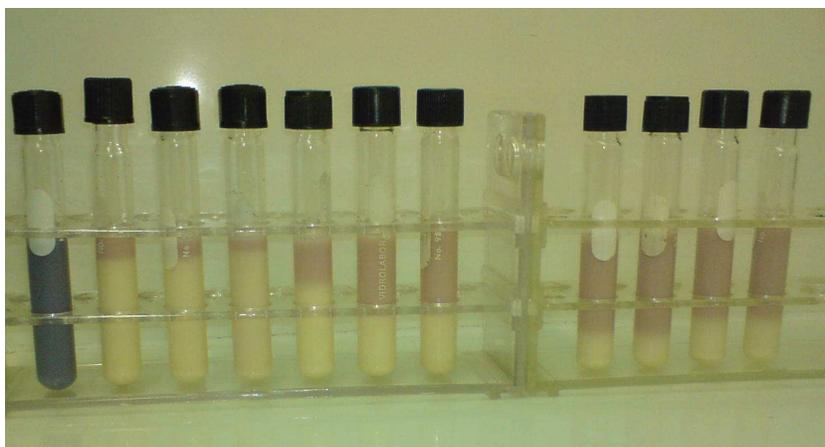


Figura 6. Avaliação de *Enterococcus faecium* 946Ec isolado de queijo de coalho em leite tornassolado, após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 14 dias da esquerda para direita respectivamente

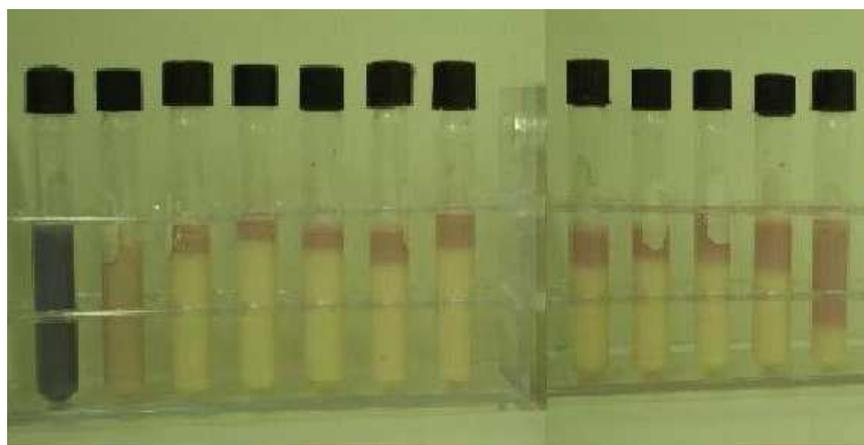


Figura 7. Avaliação de *Enterococcus faecium* ATCC 6569 em leite tornassolado, após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 14 dias da esquerda para direita respectivamente

A produção de ácido a partir da fermentação da lactose foi mais rápida a princípio na cultura de *Enterococcus faecium* 946 Ec quando comparada ao *Enterococcus faecium* ATCC 6569, já que além da coloração rosa a coagulação já era evidente após 24 horas.

Após esse período o comportamento das culturas foi bem parecido, já a coloração rosa aumentou gradativamente ao longo dos dias, sendo mais expressiva na cultura de *Enterococcus faecium* isolada de queijo de coalho.

De acordo com o teste as duas culturas não apresentam características proteolíticas, não sendo também detectado por este teste a produção de diacetil, que possivelmente pode ter ocorrido em pequena quantidade.

5.1.2 Capacidade acidificante

Dentre as características tecnológicas relacionadas à presença de bactérias do gênero *Enterococcus* em queijos, encontra-se a capacidade acidificante de algumas estirpes. Geralmente ocorre pequena queda do pH pela ação dessas bactérias, não ultrapassando pH de 5,5 após 24 horas, no entanto algumas estirpes específicas podem apresentar alto potencial acidificante (GIRAFFA, 2003).

Durlu-Ozkaya et al. (2001) verificaram que dentre várias estirpes de *Enterococcus*, apenas uma pequena porcentagem promoveu redução do pH do leite para 5,0 – 5,2, após 16 – 24 horas de incubação a 37 °C.

Morandi et al. (2006), obtiveram maior redução do pH no leite para as estirpes de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, chegando este em torno de 4,5 após 24 horas de incubação a 37 °C.

Em outro estudo Suzzi et al. (2000) verificaram um maior poder de acidificação para o *Enterococcus faecium* quando comparado ao *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus durans*, apresentando pH de 4,5 após 24 horas de incubação.

A atividade acidificante de *Enterococcus faecium* 946Ec utilizado no nosso trabalho, durante crescimento em leite, é apresentada na Figura 8.

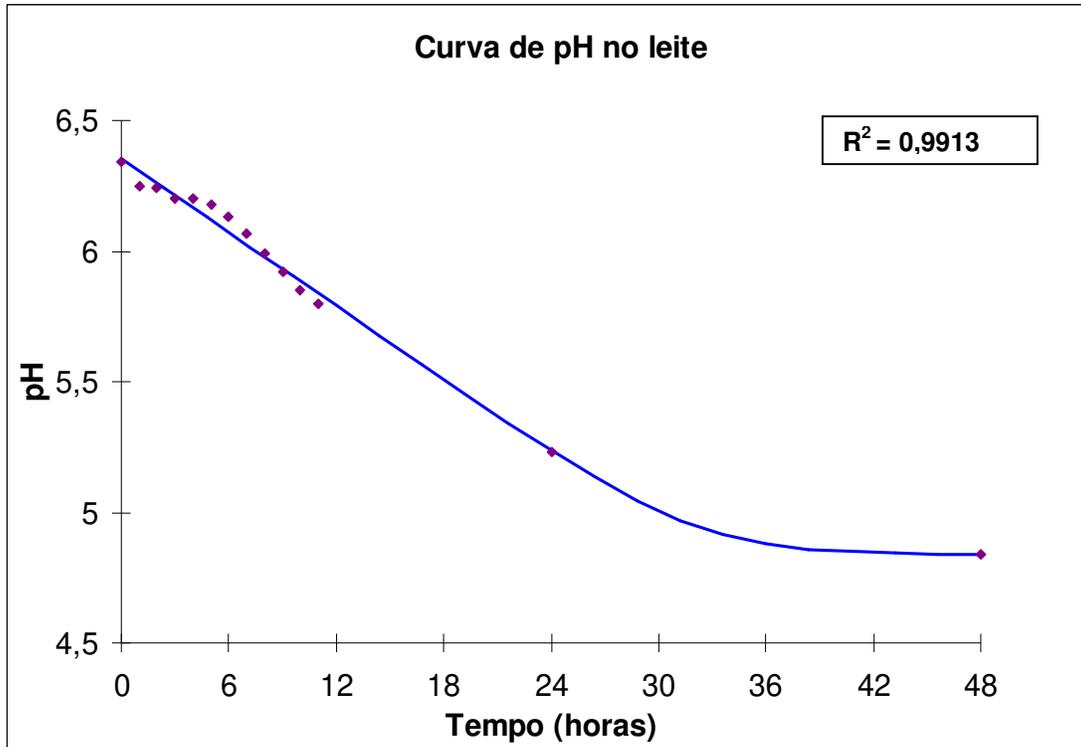


Figura 8. Capacidade de acidificação de *Enterococcus faecium* 946Ec isolado de queijo de coalho artesanal, em leite no período de 0 a 48 horas, de acordo com o modelo de Barany e Roberts (1995) ($y(t) = y_0 + (\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)} - 1}{e^{y_{\text{máx}} - y_0}} \right)$)

Para ser utilizada na fabricação de queijos, uma cultura láctica deverá reduzir o pH do leite a seu ponto isoelétrico (pH de aproximadamente 4,6) no tempo de 10 a 24 horas, promovendo assim a coagulação (FOX et al. 2000).

A cultura de *Enterococcus faecium* avaliada, não pode ser considerada como rápida produtora de ácido, estando o pH em 5,23 após 24 horas de incubação no leite a 35 °C, e mesmo após 48 horas e este não atingiu o valor de 4,6 necessário a coagulação, já que apresentava valor de 4,84.

Segundo Carvalho (2007), a habilidade em produzir ácido não é uma característica estável entre os diferentes gêneros de Bactérias Ácido Lácticas (BAL), podendo apresentar inúmeras variações de acordo com a espécie, origem do isolado, temperatura e tempo de incubação, meio de crescimento, entre outros. Além disso, provavelmente esta é uma das características apresentadas pela

maioria das bactérias isoladas do queijo de coalho, já que este apresenta pH elevado.

5.1.3 Produção de diacetil

Outra importante característica tecnológica é a capacidade de algumas espécies de *Enterococcus* em metabolizar o citrato, com conseqüente produção de compostos sápidos e aromáticos como o acetato, acetaldeído e principalmente o diacetil (GIRAFFA, 2003).

Freitas et al. (1999), observaram que o *Enterococcus faecalis* apresentou maior ação quanto ao metabolismo do citrato em relação ao *Enterococcus faecium*, demonstrando a diferença entre as espécies.

O teste de produção de citrato para cultura de *Enterococcus faecium* foi positivo, indicado pelo aparecimento do halo avermelhado na parte superior do tubo, sendo este mais evidente após o período de cerca de 40 minutos.

Esta é considerada uma característica muito importante em alguns tipos de queijos, como o queijo de coalho. Em pesquisa realizada com amostras de queijo de coalho comercializado na região da cidade de Campinas, foi verificado que para os consumidores, o sabor e aroma de manteiga foram as características mais apreciadas para este tipo de queijo, sendo portanto, considerados os atributos de maior impacto na qualidade do produto, influenciando diretamente a decisão de compra (PEREZ, 2005).

De acordo com Perez (2005), tais atributos, bastante valorizados pelos consumidores de queijos, podem estar relacionados ao tratamento térmico que pode promover a seleção de microrganismos capazes de produzir o diacetil, através do metabolismo do citrato, sendo este o composto responsável pelo desenvolvimento do sabor e aroma de manteiga no queijo.

Assim bactérias do gênero *Enterococcus* podem se desenvolver nos queijos, por serem capazes de sobreviver a temperaturas de pasteurização, ou por uma contaminação pós-processamento. Encontrando um meio então livre de competidores, o que favorece sua rápida multiplicação, podem metabolizar o citrato com produção de compostos sápidos e aromáticos.

5.2 Contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* no leite cru

A contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* no leite cru foi realizada com o objetivo de determinar a contaminação inicial do leite que chega às indústrias de laticínios, entrando em contato com equipamentos e utensílios, como silos de armazenamento, tanques de processamento de queijos, entre outros, podendo contaminá-los e iniciar o processo de formação de biofilme bacteriano para casos em que o sistema de higienização seja ineficiente.

As colônias de *Enterococcus* spp. presente no leite cru (Figura 9) em meio seletivo ágar KF *Streptococcus* foram comparadas aquelas obtidas a partir do plaqueamento da cultura de *Enterococcus faecium* ATCC 6569 (Figura 10).

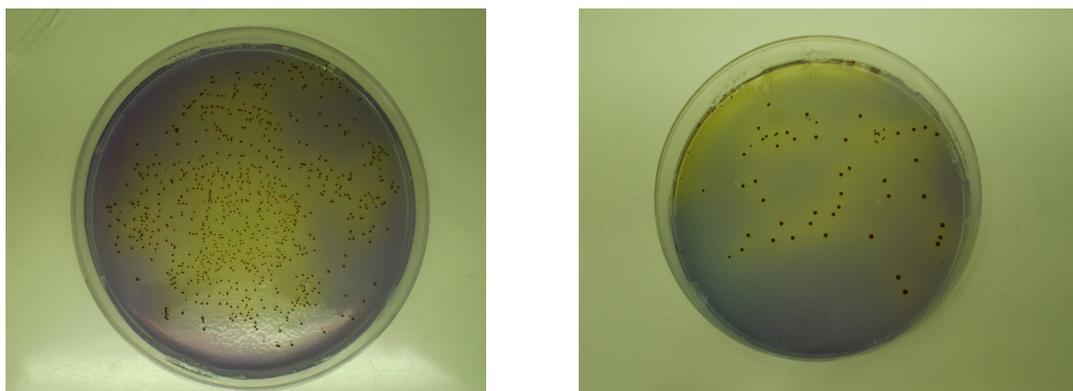


Figura 9. Crescimento de *Enterococcus* spp. presente do leite cru em meio diferencial ágar KF *Streptococcus*, após incubação a 45 °C por 48 horas

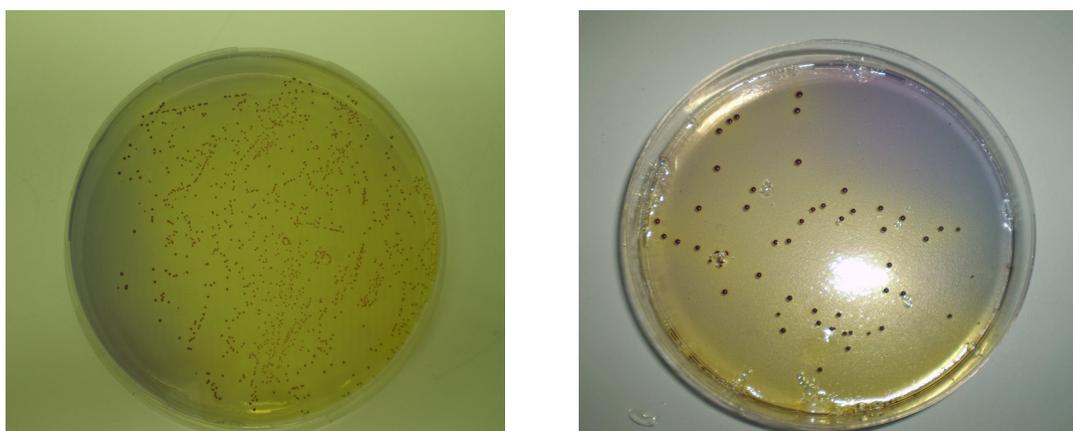


Figura 10. Crescimento de *Enterococcus faecium* ATCC 6569 em meio diferencial ágar KF *Streptococcus*, após incubação a 45 °C por 48 horas

As Figuras 9 e 10 permitem observar as semelhanças entre as colônias obtidas a partir da contagem de *Enterococcus* spp. presente no leite cru, e *Enterococcus faecium* ATCC 6569, apresentando as características principais atribuídas a colônias de bactérias deste gênero quando incubadas em meio diferencial ágar KF *Streptococcus*, colônias vermelhas pela redução de TCC a formazan, rodeadas de halo amarelo pela formação de ácido detectado pelo indicador bromocresol púrpura.

A contagem média encontrada das três repetições foi de $2,2 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, sendo assim foi definido que o inóculo inicial para os testes de avaliação da formação de biofilme seria de aproximadamente 1×10^4 UFC.mL⁻¹.

Resultado semelhante foi encontrado por Souto (2006), que obteve uma contagem de $4,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ de *Enterococcus* spp. no leite cru. Em outra pesquisa Souto et al. (2005) encontraram uma média de $1,8 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ de *Enterococcus* spp. em amostras de leite cru de propriedades no Estado de São Paulo. Já na pesquisa realizada por Gelsomino et al. (2001), esta contagem foi de 1×10^2 UFC.mL⁻¹, a menor contagem possivelmente se deve a características específicas do leite de diferentes regiões.

Segundo Giraffa (2003), os níveis de *Enterococcus* na massa do queijo podem chegar de 10^4 a 10^6 UFC.g⁻¹ e ao final do período de maturação, de 10^5 a 10^7 UFC.g⁻¹.

5.3 Curva de crescimento

O modelo proposto por Barany e Roberts (1995) consiste de um modelo primário matemático preditivo, que vem sendo muito utilizado atualmente (SPINELLI, 2006). Esse modelo permite através do software DMFit a avaliação da curva de crescimento, que pode ser visualizada na Figura 11.

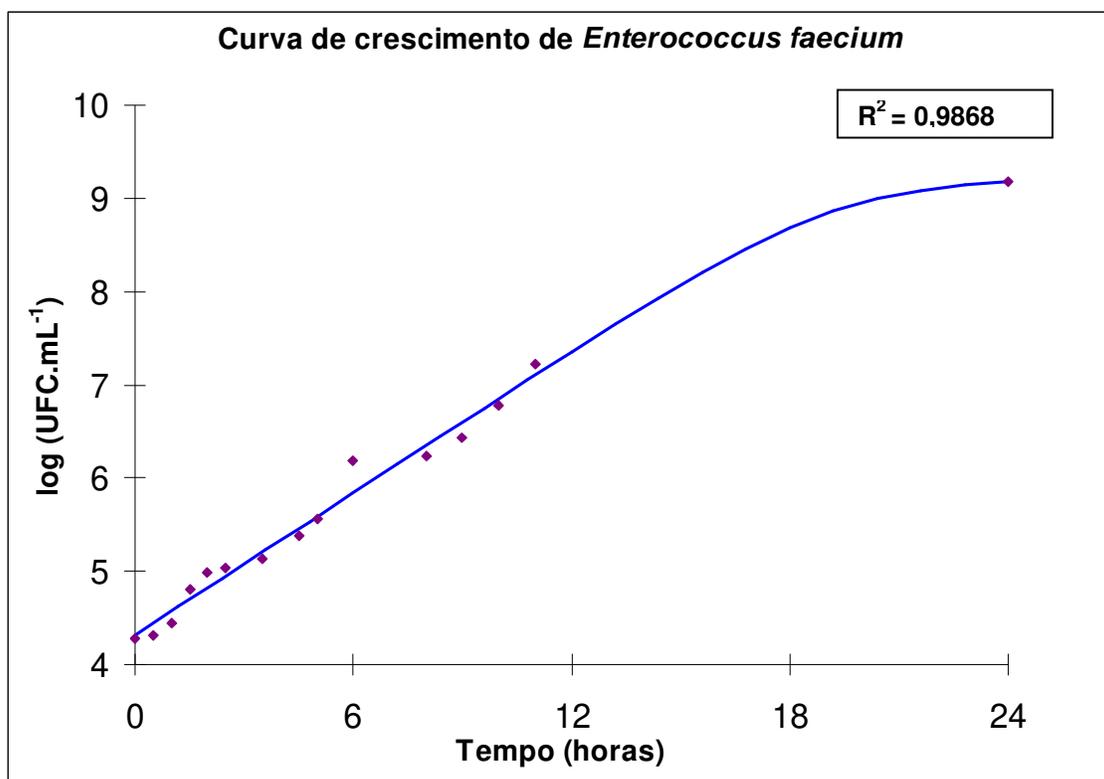


Figura 11. Curva de crescimento de *Enterococcus faecium* 946Ec isolado de queijo de coalho, em caldo MRS *Lactobacilli*, incubado a 35 °C durante 24 horas, de acordo com o modelo de Barany e Roberts (1995) ($y(t) = y_0 + (\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\text{máx}} \cdot A(t)} - 1}{e^{y_{\text{Max}} - y_0}} \right)$)

O inóculo inicial foi de aproximadamente 1×10^4 UFC.mL⁻¹, já que esta contagem foi a utilizada na avaliação da formação de biofilme por ter sido esta a concentração detectada no leite cru (item 5.2).

Após 12 horas a contagem era de $2,25 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, e após 24 horas se mantinha estável em $1,48 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹. Resultado semelhante foi obtido por Andrade, Ajao e Zottola (1998), para avaliação do crescimento de *Enterococcus faecium* em caldo MRS, já que após 24 horas a contagem era de 1×10^9 UFC.mL⁻¹, quando o inóculo inicial foi de aproximadamente 1×10^6 UFC.mL⁻¹.

Assim foi determinado o tempo de incubação a 35 °C do caldo MRS inoculado para os repiques de ativação da cultura, para que este fosse realizado na fase de crescimento constante da cultura, promovendo maior padronização do experimento.

5.4 Avaliação da formação de biofilme de *Enterococcus faecium*

5.4.1 Avaliação da rugosidade

O aço inoxidável pode ser produzido em diferentes graus, que variam principalmente em função de sua composição de ferro, cromo e níquel, e diferentes polimentos de acordo com a finalidade o que influencia a adesão bacteriana em função das suas várias microtopografias e propriedades físico-químicas (JULLIEN et al., 2002).

A rugosidade encontrada expressa uma média de nove repetições, sendo esta de 0,366 μm , com incerteza de 7,3%. Este resultado se encontra dentro da faixa determinada pela American Society for Testing and Materials (ASTM) para o acabamento número 4, que pode variar de 0,15 a 0,40 μm , obtido a partir de lixamento úmido, com lixas abrasivas de grana que variam de 180 a 220 (Aço inox, 2006), podendo portanto ser considerado adequado para utilização nas indústria de alimentos.

Segundo Flint, Brooks e Bremer (2000), a rugosidade superficial do aço inoxidável utilizado em indústrias de laticínios não deve ultrapassar 0,8 μm , de forma a garantir a segurança das usinas de processamento em termos higiênicos.

5.4.2 Formação de biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável

Os resultados da adesão e formação de biofilme de *Enterococcus faecium* na superfície de aço inoxidável, obtido pela técnica de contagem padrão em placas expressos em $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ em função do tempo de contato e temperatura de incubação são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Formação de biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável avaliada pela contagem padrão em placas

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	log UFC.cm ⁻² ± DP**
4,5	4	1,91 ± 0,01
10,5	1,2	1,17 ± 0,13
	6,8	3,15 ± 0,74
25	0	0,30 ± 0,28
	4	5,70 ± 0,10
	4	5,88 ± 0,02
	4	6,14 ± 0,30
	8	5,15 ± 0,13
39,5	1,2	5,38 ± 0,12
	6,8	6,91 ± 0,51
45,5	4	3,77 ± 0,11

*Média de três repetições

** Desvio padrão

Em relação ao tempo de contato observa-se (TABELA 5) que o aumento de 1,2 para 6,8 dias nas temperaturas de 10,5 e 39,5 °C promoveu aumento em média de 1,98 e 1,53 ciclos log respectivamente, o que demonstra a influência do tempo de contato na formação de biofilmes. Em equipamentos que tiveram uma higienização incorreta, por exemplo, os microrganismos permanecem em contato com o mesmo por longo tempo, podendo iniciar o processo de formação de biofilmes.

No entanto quando se compara os tempos de 4 e 8 dias a 25 °C, observa-se um decréscimo em média de 0,75 ciclos log, o que pode ser explicado pelo fato de que segundo Forsythe (2002), Telgmann, Horn e Morgenroth (2004), com o tempo o biofilme pode desprender no meio grandes fragmentos, o que diminui sua contagem até que esta se restabeleça, promovendo a contaminação dos alimentos em altos níveis.

Observa-se que com o aumento da temperatura de 4,5 para o 25 °C (TABELA 5), o aumento do número de células de *Enterococcus faecium* aderidas foi em média de 3,99 ciclos log para o tempo de contato de 4 dias. Quando a comparação é feita entre as temperaturas de 25 e 45,5 °C para o mesmo tempo,

ocorre um decréscimo do número de células aderidas em média de 2,13 ciclos log. Comparando-se a temperatura de 10,5 e 39,5 °C, para 1,2 e 6,8 dias houve aumento de 4,21 e 3,76 ciclos log respectivamente.

Estes resultados demonstram a influência da temperatura no processo de adesão e formação de biofilme bacteriano. O *Enterococcus faecium* é um microrganismo psicrotrófico, e por isso embora apresente capacidade de crescer sob refrigeração, segundo Hartman, Deibel e Sieverding (1992) sua temperatura ótima de crescimento é de 35 °C. À medida que a temperatura se distancia da ótima, o crescimento do microrganismo decresce, o que explica a maior taxa de adesão nas temperaturas de 39,5 e 25 °C quando comparadas a 4,5, 10,5 e 45,5 °C.

O efeito da temperatura em relação ao crescimento de *Enterococcus faecium* no caldo MRS pode ser visualizada na Tabela 6.

Tabela 6. Contagem de *Enterococcus faecium* no caldo MRS *Lactobacilli* após dois dias de incubação

Temperatura (°C)	log UFC.mL ⁻¹ * ± DP**
4,5	3,69 ± 0,07
10,5	4,25 ± 0,01
25	8,59 ± 0,01
39,5	8,88 ± 0,57
45,5	7,68 ± 0,12

*Média de três repetições

** Desvio padrão

As Tabelas 5 e 6 permitem observar a relação entre a taxa de adesão e formação de biofilme e a contagem no meio de cultivo, já que os tratamentos com maior contagem no meio de cultivo também apresentaram maior taxa de adesão aos cupons de aço inoxidável.

As contagens do caldo MRS após dois dias de contato, nas temperaturas avaliadas no experimento (TABELA 6), demonstram ainda que embora a baixas temperaturas o crescimento do microrganismo tenha sido limitado, este permaneceu no meio podendo aderir a superfície.

Assim caso ocorra um aumento na temperatura ele poderá se desenvolver rapidamente e iniciar o processo de formação de biofilme bacteriano, como foi verificado nas temperaturas mais altas, como a 25 °C que caracteriza a temperatura ambiente.

De acordo com Brito e Brito (2001), o leite deve ser armazenado a temperatura em torno de 4 °C, e caso ocorra abuso os microrganismos presentes poderão se desenvolver rapidamente. No entanto o armazenamento prolongado mesmo sob refrigeração pode promover alterações no leite pelo desenvolvimento de psicotróficos.

Para Fox et al. (2000) uma das principais causas de contaminação em leite e produtos lácteos são os equipamentos higienizados de forma insatisfatória, já que o leite é um alimento muito rico nutricionalmente e a presença de resíduos nas superfícies torna-se um importante substrato ao crescimento microbiano, o que se agrava pelo fato de que os equipamentos permanecem a temperatura ambiente, geralmente acima de 15 °C.

Ronner e Wong (1993) consideram que para ser denominado biofilme, o número mínimo de células aderidas deve ser de 10^5 UFC.cm⁻², sendo este o padrão mais utilizado pelos pesquisadores. Nos tratamentos de 25 °C por 4 e 8 dias, 39,5 °C por 1,2 e 6,8 dias ocorreu a formação de biofilme, enquanto nos demais tratamentos ocorreu somente o processo de adesão.

Existem poucos estudos da formação de biofilme por bactérias do gênero *Enterococcus* em superfícies de contato com alimentos, sendo mais encontrados na área médica e odontológica devido à patogenicidade atribuída a maioria das estirpes encontradas em amostras clínicas. Devido a grande diferença entre estirpes presentes em ambientes hospitalares e de processamento de alimento a comparação entre os resultados obtidos nestes ambientes para adesão e formação de biofilme, seria contraditória.

Dentre os estudos que avaliaram a adesão e formação de biofilme de *Enterococcus* em superfícies utilizadas na indústria de alimentos, Andrade, Ajao e Zottola (1998), observaram contagem de 4,5 e 5 log de UFC.mm⁻² de

Enterococcus faecium em superfície de aço inoxidável após 24 horas a 35 °C, quando a contagem inicial era de aproximadamente 1×10^3 e 1×10^6 UFC.mL⁻¹.

Figueiredo (2000), também verificou a capacidade de adesão de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável em equipamento modelo de linha de processamento de leite, encontrando uma contagem de $6,5 \times 10^5$ UFC.cm⁻² após 12 horas a temperatura de 18 °C.

Timelli et al. (2006) encontraram em indústria de processamento de queijo contagem de bactérias do gênero *Enterococcus* de 2,31, 1,05 e 2,03 log UFC.cm⁻² no piso, parede e bandeja de queijo respectivamente.

5.4.3 Modelagem da adesão e formação de biofilme

A Tabela 7 apresenta a análise de variância do logaritmo decimal do número de UFC.cm⁻² de células de *Enterococcus faecium* aderidas aos cupons de aço inoxidável em função do tempo e temperatura.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para formação de biofilme de *Enterococcus faecium* em aço inoxidável

	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	40,519	4	10,130	6,864	0,020
Falta de ajuste	8,757	4	2,189		
Erro Puro	0,097	2	0,049		
Resíduos	8,854	6	1,476		
Total	49,373	10			

F_{tab}(reg/res)=4,53

A análise de variância indicou que o modelo foi significativo ($p < 0,05$) (TABELA 7), o Fcalculado encontrado foi 1,5 vezes maior que o Ftabelado e o coeficiente de correlação (R^2) foi igual a 0,82 validando o modelo encontrado e demonstrando que este se ajusta bem aos dados experimentais.

Os coeficientes de regressão, com os parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,05$), são apresentados na Tabela 8. Foram significativos no

nível linear e no quadrático, as variáveis tempo e temperatura, no entanto a este nível de significância a interação entre os fatores lineares não foi significativa, o que pode ser visualizado através do gráfico de Pareto (FIGURA 12).

Tabela 8. Coeficientes significativos do modelo

Coeficientes significativos	Valores
Média	5,91340
Temperatura	1,32605
Temperatura ²	-1,19139
Tempo	1,29446
Tempo ²	-1,25259

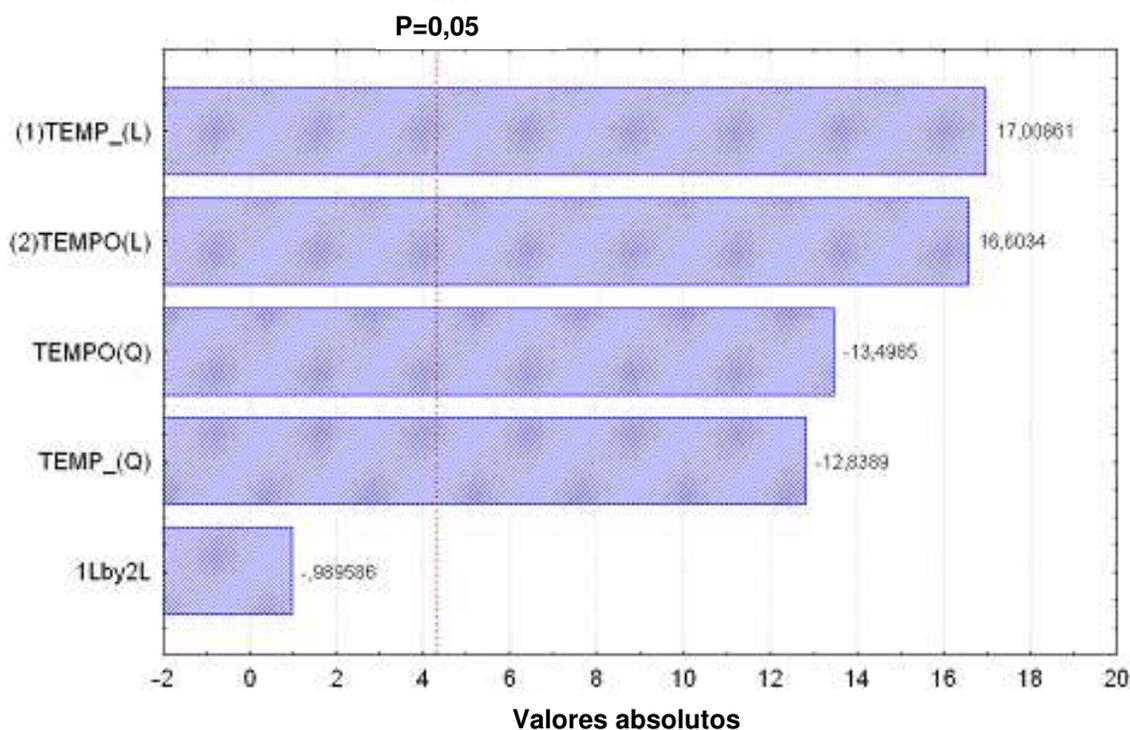


Figura 12. Gráfico de Pareto para análise dos efeitos dos fatores na variável resposta

Qualquer efeito que excedeu a linha vertical ($P=0,05$) (FIGURA 12) foi considerado relevante, assim os fatores tempo, tempo², temperatura e temperatura² foram significativos. Destes a temperatura foi o fator que apresentou maior influência na taxa de adesão de *Enterococcus faecium* em aço inoxidável.

Com estes resultados foi elaborado o modelo matemático que descreve o processo de formação de biofilme por *Enterococcus faecium* em função do tempo de temperatura. O modelo com as variáveis codificadas é descrito abaixo:

$$\log \text{UFC. cm}^{-2} = 5,91340 + 1,32605T - 1,19139T^2 + 1,29446t - 1,25259t^2$$

t: tempo; T: temperatura

A partir da equação é possível encontrar os valores previstos para o comportamento da adesão de formação de biofilme de *Enterococcus faecium* em aço inoxidável em diferentes condições de tempos e temperaturas encontrados na indústria de alimentos.

Segundo Peña (2005) estes modelos de predição podem ser de grande importância na tomada de decisões em relação aos procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos, pois permitem uma melhor elucidação do processo de adesão e formação de biofilme bacteriano.

A análise da superfície resposta e curvas de contorno geradas pelo modelo (FIGURA 13) permitem verificar a existência de uma região ótima para formação de biofilme de *Enterococcus faecium*, onde se encontra uma faixa de combinações que variam aproximadamente de 3 a 7,5 dias para o tempo de contato e para a temperatura de exposição de 22 a 43 °C.

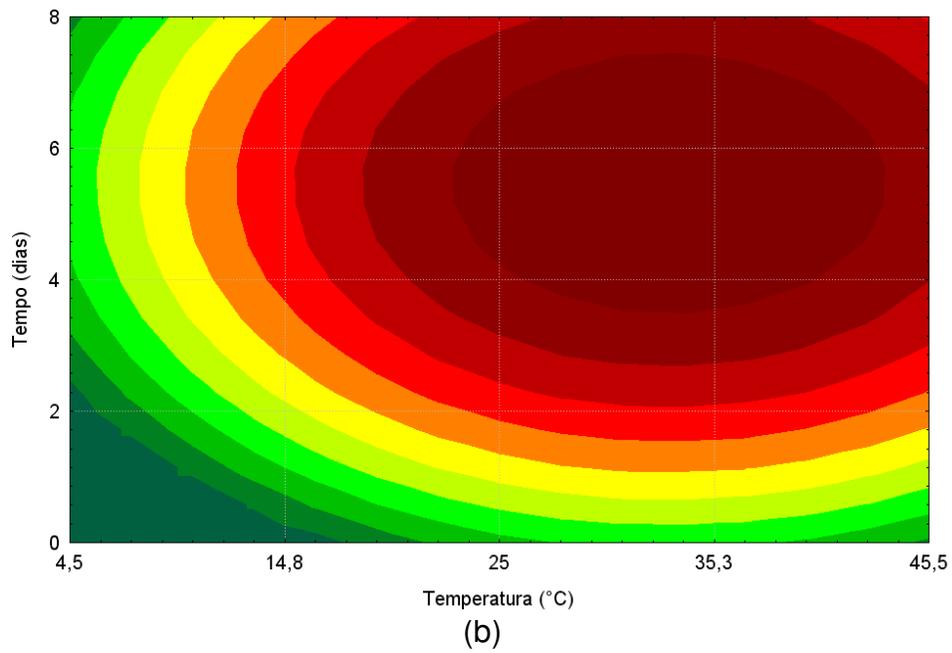
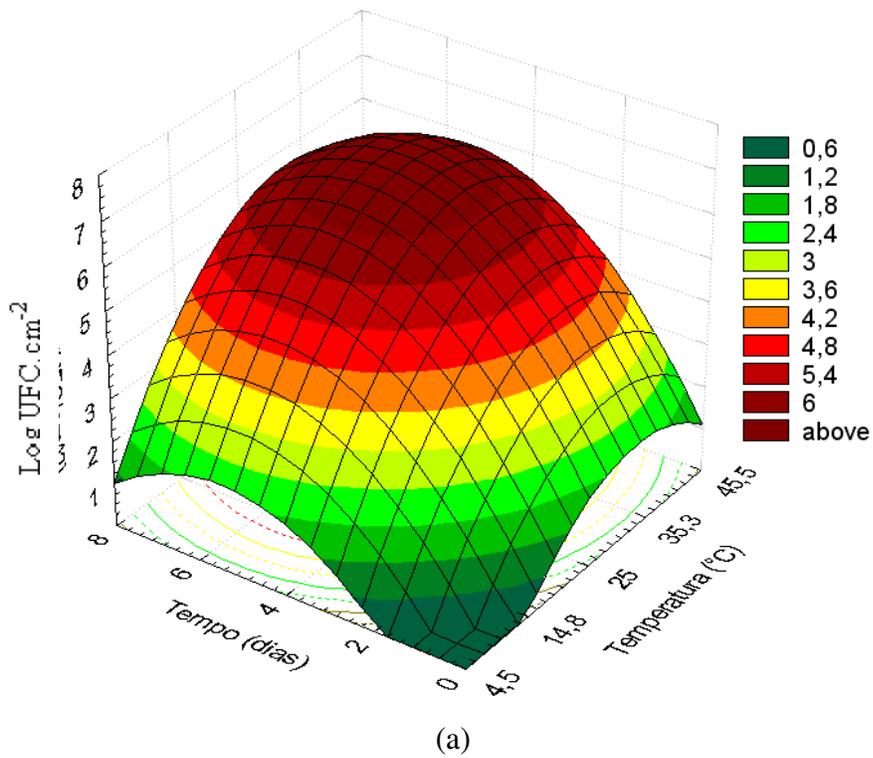


Figura 13. Superfície resposta (a) e curvas de contorno (b) em função do tempo de contato e temperatura de exposição para adesão de *Enterococcus faecium* 946Ec em aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4

5.4.4 Verificação experimental do modelo encontrado

Para verificação dos modelos encontrados foram conduzidos ensaios experimentais em condições que não haviam sido avaliadas e utilizadas na implementação dos modelos, como forma de testar o desempenho do modelo encontrado, verificando se este descreve bem os resultados reais. A média dos resultados podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação da média dos resultados da adesão de *Enterococcus faecium* em aço inoxidável obtidos experimentalmente e pelo modelo preditivo

Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Experimental log UFC.cm ⁻² ± DP**	Predito log UFC.cm ⁻²	Desvio	Desvio relativo (%)
18	2	3,39 ± 0,18	3,43	-0,04	-1,18
	4	4,99 ± 0,39	4,99	0	0
	6	5,39 ± 0,60	5,28	0,11	2,04
35	4	6,03 ± 0,38	6,26	-0,23	-3,81
	5	6,61 ± 1,26	6,97	-0,36	-5,44

*Média de três repetições

**Desvio padrão

Podemos observar que com exceção ao resultado obtido para análise a 18 °C por 4 dias de contato em que os resultados experimentais e preditos foram iguais e para 18 °C por 6 dias em que o valor encontrado foi pouco maior que o predito, nos resultados para os outros ensaios os valores preditos foram maiores que os encontrados experimentalmente, ou seja, as predições tenderam para o lado seguro, já que as taxas de adesão preditas foram superiores às experimentais. Esta pode ser considerada uma relação importante quando o modelo é ajustado para auxiliar na determinação de procedimentos de higienização nas indústrias de alimentos, pois predições menores que as reais poderiam colocar em risco a segurança destes, enquanto predições maiores que as reais resultam em maior controle do processo.

5.5 Microscopia eletrônica de varredura

Foram obtidas fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da superfície de aço inoxidável para visualização de sua topografia (FIGURA 14), e também da mesma superfície submetida ao processo de adesão de formação de biofilme por *Enterococcus faecium*, em algumas das combinações de tempo e temperatura utilizadas na elaboração do modelo (FIGURAS 15, 16, e 17).

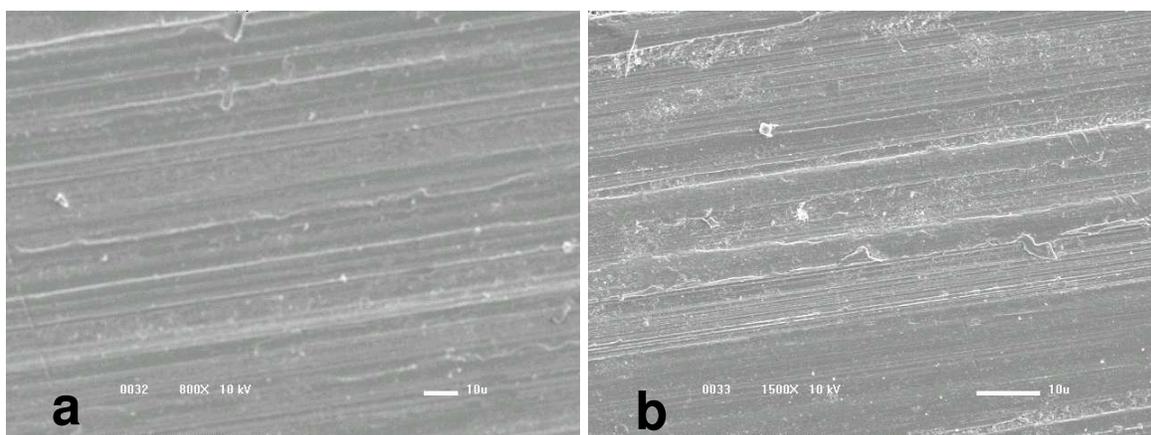


Figura 14. Fotomicrografia de superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, não submetido ao processo de adesão, observada por microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de: a) 800 x, b) 1500 x

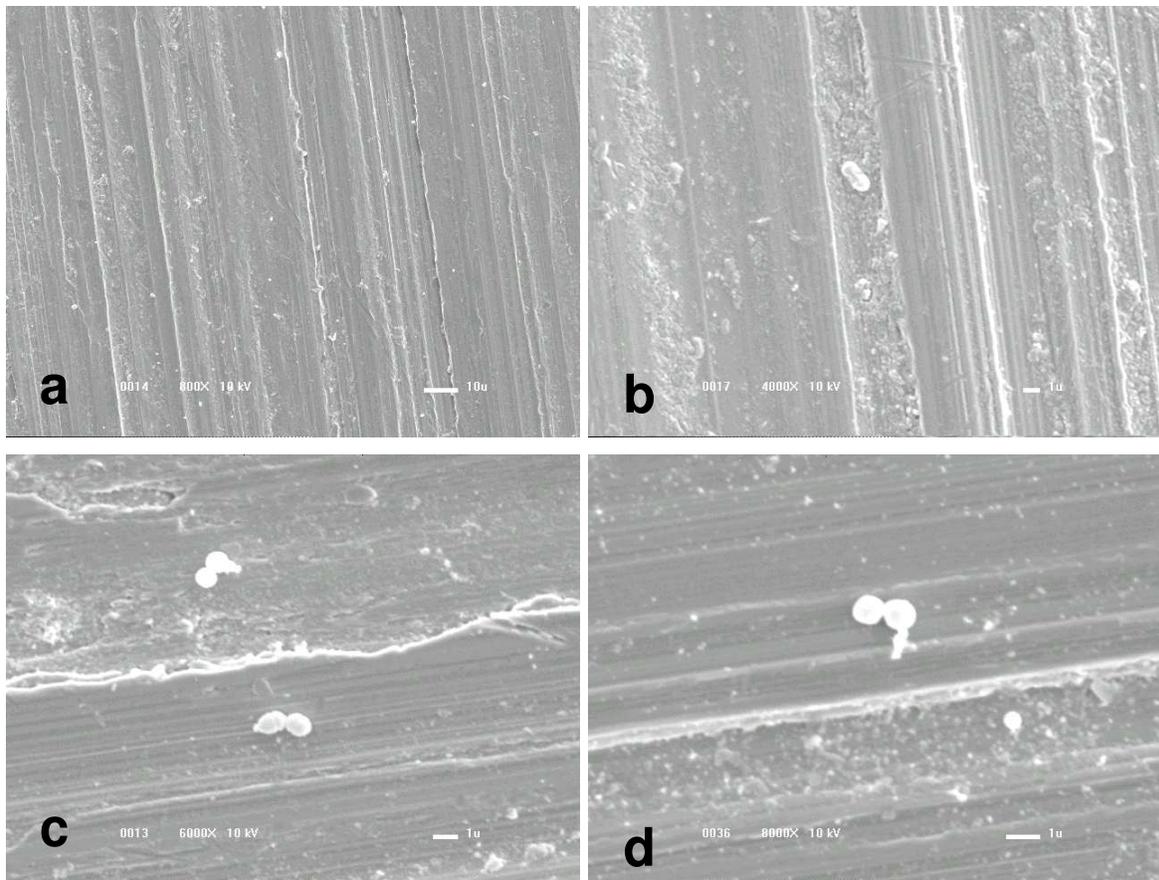


Figura 15. Fotomicrografia observada por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, submetida ao processo de adesão por *Enterococcus faecium* 946Ec a 4,5 °C por 4 dias, nos aumentos de: a) 1500 x, b) 4 000 x, c) 6000 x, d) 8000 x

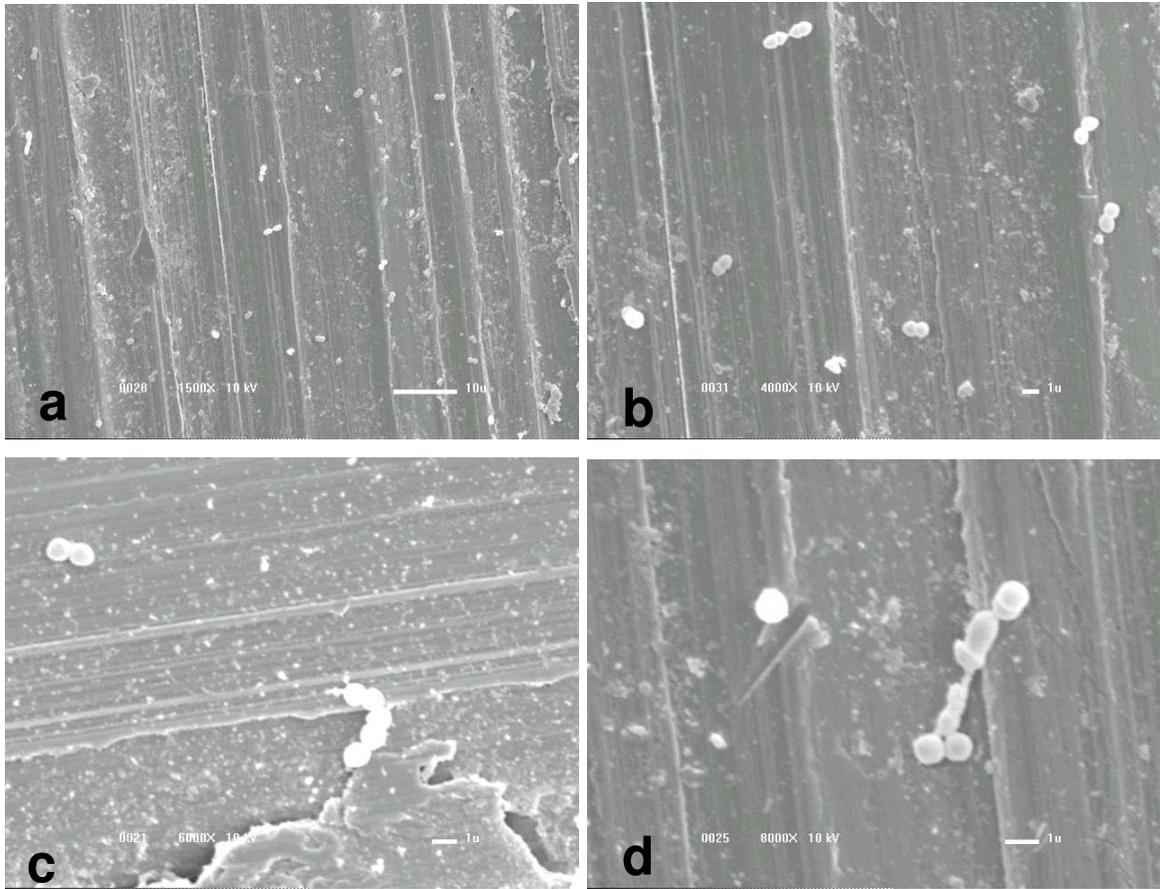


Figura 16. Fotomicrografia observada por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, submetida ao processo de adesão por *Enterococcus faecium* 946Ec a 25 °C por 4 dias, nos aumentos de: a) 1500 x, b) 40 00 x, c) 6000 x, d) 8000 x

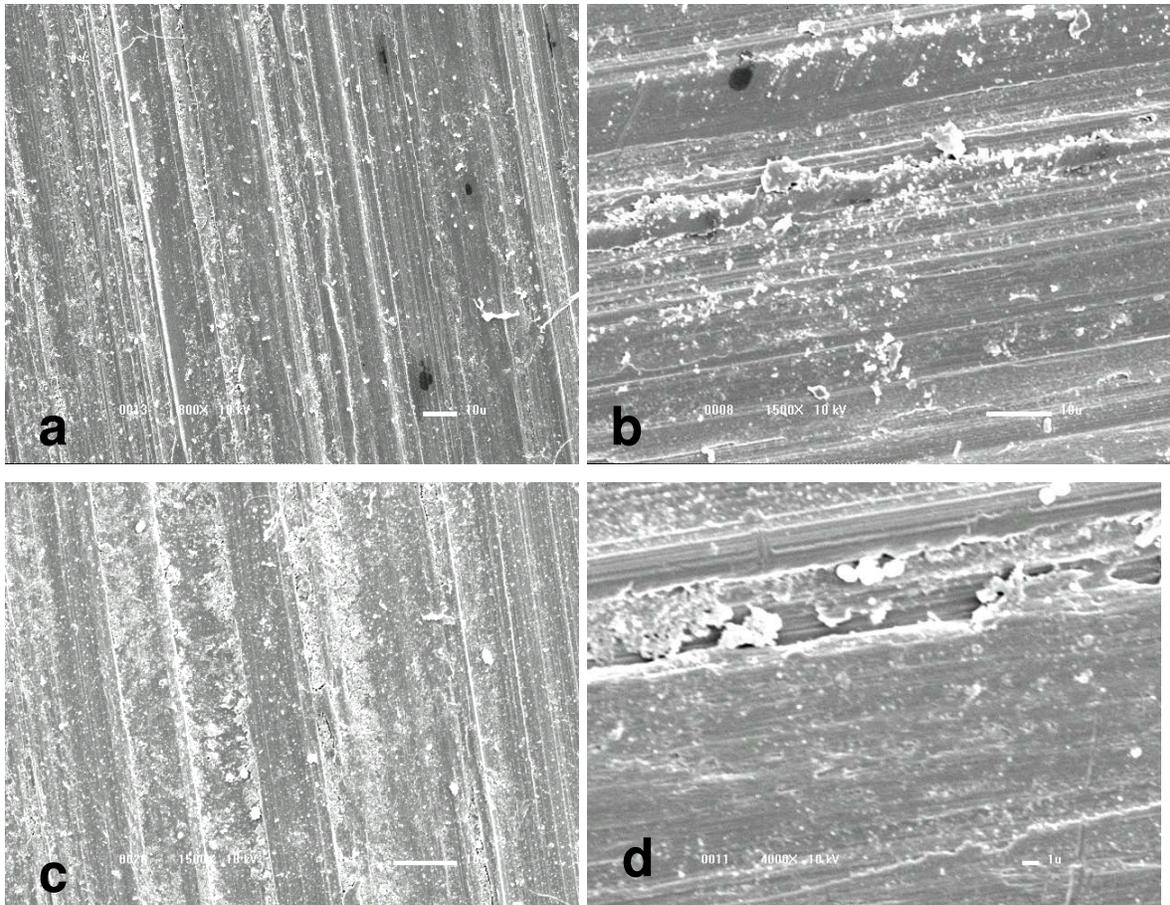


Figura 17. Fotomicrografia observada por microscopia eletrônica de varredura, de superfície de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, submetida ao processo de adesão por *Enterococcus faecium* 946Ec a 39,5 °C por 6,8 dias, nos aumentos de: a) 800 x, b) 1500 x, c) 1500 x, d) 4000 x

A observação microscópica permitiu a visualização de pequenas irregularidades ao longo da superfície do aço inoxidável, sendo detectado alguns pontos de maior irregularidade como na Figura 16c. Segundo Bower, McGuire e Daeschel (1996), as imperfeições encontradas nas superfícies podem diminuir a eficiência dos procedimentos de higienização e facilitar a penetração de resíduos de alimentos que servirão de substrato para a adesão bacteriana, crescimento e formação do biofilme.

Como a contagem em placas a 4,5 °C por 4 dias foi pequena, caracterizando apenas a etapa de adesão e não a de formação de biofilme, pela

observação microscópica (FIGURA 15) da superfície também não foi possível a visualização de grande concentração de células, encontrando-se estas bastante dispersas ao longo do cupom de aço inoxidável avaliado.

A avaliação do cupom submetido ao processo de formação de biofilme a 25 °C por 4 dias, permitiu melhor identificação das células de *Enterococcus faecium*, que se caracterizaram como diplococos, já que na maioria das vezes foram visualizados em pares. Esse tratamento permitiu ainda a contagem em UFC.cm⁻² das bactérias aderidas, pelo fato das células terem se distribuído mais uniformemente na área do cupom. As contagens de *Enterococcus faecium* através das fotomicrografias (FIGURAS 16a e 16b) foram em média 4,08 x 10⁵ UFC.cm⁻², estando esta muito próxima a contagem padrão em placas que apresentou média de 8,93 x 10⁵ UFC.cm⁻², para as mesmas condições de tempo e temperatura de exposição. A diferença entre as contagens embora considerada pequena são possivelmente devido a variações entre os métodos, que permitem erros experimentais, além da possível aglomeração de células em determinados pontos da superfície, o que dificulta sua contagem quando se utiliza a microscopia.

Tais aglomerações que caracterizam os biofilmes podem ser visualizadas nas fotomicrografias obtidas pela avaliação a 39,5 °C por 6,8 dias (FIGURAS 17a, 17b, 17c e 17d), além da presença de exopolissacarídeos, representados pelas manchas brancas não encontradas nas fotomicrografias de menor adesão. Assim como na contagem padrão em placas, em que esse foi o tratamento que obteve maior taxa de adesão, os cupons vistos por microscopia evidenciaram a concentração de células, não permitindo, portanto a contagem em UFC.cm⁻², para a comparação.

5.6 Avaliação da eficiência dos sanitizantes

O teste de diluição de uso é bastante utilizado na determinação da maior diluição do sanitizante que ainda apresenta eficiência bactericida e para avaliação da eficiência das concentrações recomendadas pelos fabricantes. Neste teste células de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, de *Staphylococcus aureus*

ATCC 6538 e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, aderidas a superfície de cilindros de aço inoxidável são submetidas à ação de sanitizantes, sendo aprovadas apenas as diluições que destruam o microrganismo em 59 dos 60 cilindros avaliados, após 10 minutos de contato (ANDRADE; CARELI; MARTINS, 2008).

Este teste é utilizado como base para avaliação de resistência a sanitizantes também para outros microrganismos. No entanto, apresenta algumas limitações, sendo a principal delas a não simulação adequada das condições usuais nas indústrias de alimentos (ANDRADE; CARELI; MARTINS, 2008), como o tempo de contato entre os cilindros e o microrganismo, que é de 15 minutos, não prevendo uma possível formação de biofilme bacteriano.

Os resultados obtidos para contagem das células recuperadas de biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável, após submetidas a ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 100 mg.L^{-1} e ácido peracético a 300 mg.L^{-1} são apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Observa-se que nestas concentrações recomendadas pelos fabricantes e utilizadas nas indústrias de alimentos, em especial nos laticínios, houve resistência do microrganismo, sendo detectado crescimento em 60 cupons submetidos à ação do hipoclorito de sódio e em 57 cupons submetidos à ação do ácido peracético.

Tabela 10. *Enterococcus faecium* 946Ec aderido em superfície de aço inoxidável após 10 minutos de contato com o sanitizante hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹

Hipoclorito de sódio 100 mg.L ⁻¹							
Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²
1	2,74	16	2,37	31	2,38	46	3,10
2	2,76	17	2,77	32	2,65	47	1,99
3	2,99	18	2,66	33	2,39	48	4,25
4	3,67	19	1,87	34	2,74	49	1,53
5	2,19	20	2,67	35	1,81	50	3,10
6	3,46	21	1,38	36	4,28	51	1,86
7	2,66	22	2,43	37	2,23	52	3,70
8	1,66	23	3,05	38	2,86	53	1,40
9	2,63	24	1,62	39	2,99	54	2,28
10	2,41	25	2,87	40	1,38	55	3,09
11	3,36	26	2,39	41	2,40	56	1,96
12	1,60	27	2,63	42	2,46	57	2,57
13	2,36	28	2,86	43	1,87	58	3,26
14	2,47	29	2,63	44	2,59	59	2,53
15	2,26	30	2,45	45	2,53	60	2,27

Tabela 11. *Enterococcus faecium* 946Ec aderido em superfície de aço inoxidável após 10 minutos de contato com o sanitizante ácido peracético a 300 mg.L⁻¹

Ácido Peracético 300 mg.L ⁻¹							
Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²
1	1,28	16	1,71	31	1,43	46	1,56
2	1,58	17	0,90	32	1,00	47	1,51
3	1,93	18	3,59	33	1,28	48	0,87
4	1,21	19	0,00	34	1,91	49	3,55
5	1,38	20	2,31	35	0,60	50	1,66
6	0,00	21	1,38	36	1,93	51	1,25
7	1,39	22	1,07	37	0,90	52	1,11
8	2,36	23	1,76	38	2,08	53	1,93
9	1,33	24	2,56	39	2,13	54	2,15
10	1,90	25	1,06	40	2,20	55	0,00
11	0,70	26	2,05	41	2,08	56	1,49
12	1,37	27	1,28	42	1,19	57	0,60
13	1,30	28	1,06	43	2,89	58	1,96
14	1,17	29	1,57	44	1,57	59	1,30
15	1,56	30	1,19	45	1,08	60	1,45

A contagem média microrganismos sobreviventes foi de 2,53 e 1,52 log UFC.cm⁻² na utilização de hipoclorito de sódio e ácido peracético respectivamente. A Figura 18 permite a comparação entre os dois sanitizantes, evidenciando um maior número de cupons nos intervalos de menor log UFC.cm⁻² para o ácido peracético, o que demonstra a prevalência de uma menor contagem deste tratamento quando comparado ao tratamento com hipoclorito de sódio.

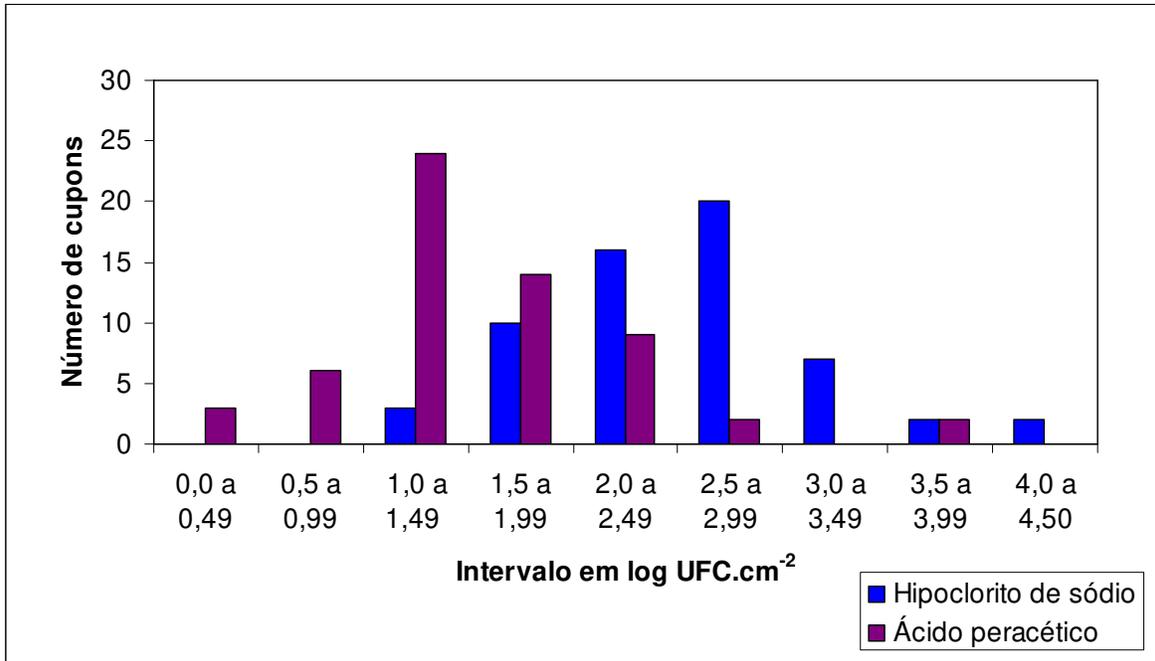


Figura 18: Contagem de *Enterococcus faecium* 946Ec recuperado em superfície de aço inoxidável, após ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹ e ácido peracético a 300 mg.L⁻¹

Como a contagem de microrganismos sobreviventes foi maior nos cupons submetidos à ação do hipoclorito de sódio, conseqüentemente o número de reduções decimais deste foi menor quando comparado ao ácido peracético, como é apresentado nas Tabelas 12 e 13.

A contagem média dos cupons utilizados como controle, foi de $3,54 \times 10^5$ UFC.cm⁻², sendo esta a contagem considerada como a inicial para o cálculo do número de reduções decimais.

Tabela 12. Número de reduções decimais de biofilme de *Enterococcus faecium* 946Ec em log UFC. cm⁻² após ação do hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹

Hipoclorito de sódio 100 mg.L ⁻¹							
Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²
1	2,80	16	3,17	31	3,16	46	2,44
2	2,78	17	2,77	32	2,89	47	3,55
3	2,55	18	2,88	33	3,15	48	1,29
4	1,87	19	3,67	34	2,8	49	4,01
5	3,35	20	2,87	35	3,73	50	2,44
6	2,08	21	4,16	36	1,26	51	3,68
7	2,88	22	3,11	37	3,31	52	1,84
8	3,88	23	2,49	38	2,68	53	4,14
9	2,91	24	3,92	39	2,55	54	3,26
10	3,13	25	2,67	40	4,16	55	2,45
11	2,18	26	3,15	41	3,14	56	3,58
12	3,94	27	2,91	42	3,08	57	2,97
13	3,18	28	2,68	43	3,67	58	2,28
14	3,07	29	2,91	44	2,95	59	3,01
15	3,28	30	3,09	45	3,01	60	3,27

Tabela 13. Número de reduções decimais de biofilme de *Enterococcus faecium* 946Ec em log UFC. cm⁻² após ação do ácido peracético a 300 mg.L⁻¹

Ácido Peracético 300 mg.L ⁻¹							
Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²	Ensaio	log UFC.cm ⁻²
1	4,26	16	3,83	31	4,11	46	3,98
2	3,96	17	4,64	32	4,54	47	4,03
3	3,61	18	1,95	33	4,26	48	4,67
4	4,33	19	5,54	34	3,63	49	1,99
5	4,16	20	3,23	35	4,94	50	3,88
6	5,54	21	4,16	36	3,61	51	4,29
7	4,15	22	4,47	37	4,64	52	4,43
8	3,18	23	3,78	38	3,46	53	3,61
9	4,21	24	2,98	39	3,41	54	3,39
10	3,64	25	4,48	40	3,34	55	5,54
11	4,84	26	3,49	41	3,46	56	4,05
12	4,17	27	4,26	42	4,35	57	4,94
13	4,24	28	4,48	43	2,65	58	3,58
14	4,37	29	3,97	44	3,97	59	4,24
15	3,98	30	4,35	45	4,46	60	4,09

A média do número de reduções decimais foi de 3,00 e 4,02 log UFC. cm⁻² para o hipoclorito de sódio e ácido peracético respectivamente. Na Figura 19 é possível a visualização das diferenças apresentadas entre os dois sanitizantes. Assim um maior número de cupons submetidos a ação do ácido peracético que se concentrou nos intervalos de maior número de reduções expresso em log UFC.cm⁻².

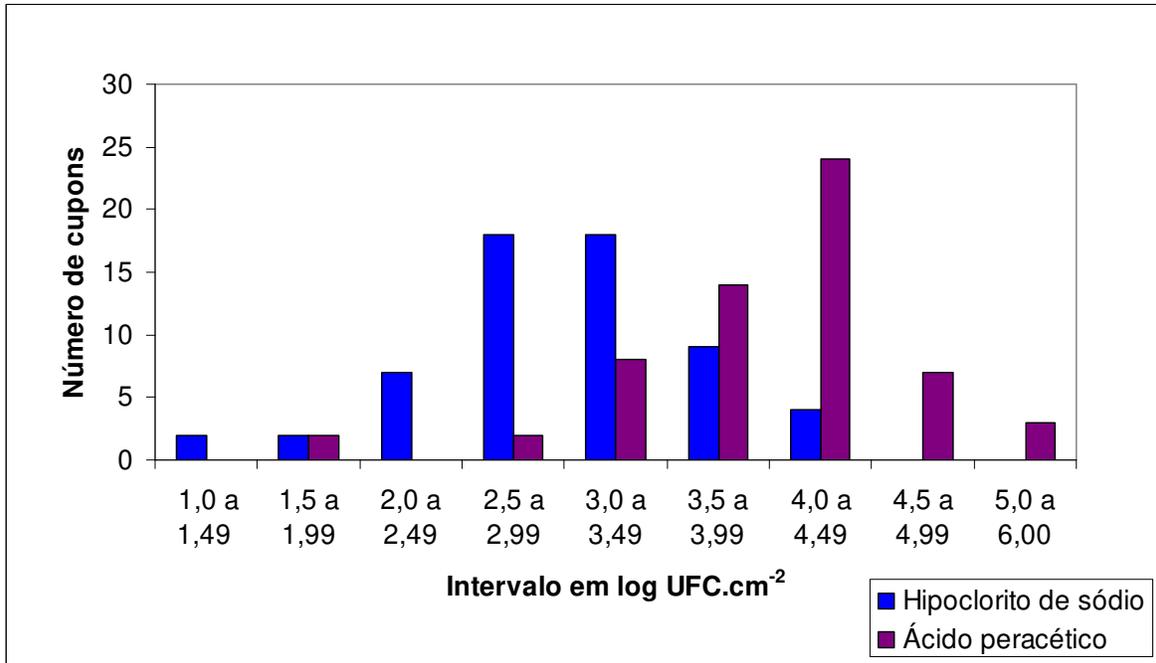


Figura 19. Número de reduções decimais de biofilme de *Enterococcus faecium* 946Ec em aço inoxidável, após ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹ e ácido peracético a 300 mg.L⁻¹

O uso de ácido peracético a 300 mg. L⁻¹ foi mais eficiente no controle de biofilme de *Enterococcus faecium* em aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4, excedendo 1,02 ciclo log na redução quando comparado ao hipoclorito de sódio a 100 mg. L⁻¹.

O ácido peracético é considerado um dos sanitizantes mais efetivos no combate a biofilmes bacterianos e sua alta eficiência tem sido atribuída a grande capacidade de oxidação do material celular (MARQUES et al., 2007; ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Este sanitizante, na concentração de 120 mg. L⁻¹ também foi considerado o mais efetivo por Andrade, Bridgeman e Zottola (1998), reduzindo a contagem de biofilme de *Enterococcus faecium* isolado de leite cru, em aço inoxidável em aproximadamente 4,8 ciclos log, após 2 minutos de contato. Para o mesmo estudo a redução foi de aproximadamente 4,0 ciclos log utilizando o hipoclorito de sódio na concentração de 100 mg. L⁻¹.

Mello (1997), obteve redução de 6,4 e 5,5 ciclos log de *Enterococcus faecium* aderido em cupons de prova de aço inoxidável em curva, para ácido peracético a 300 mg.L⁻¹ e hipoclorito de sódio a 100 mg.L⁻¹ respectivamente, após 10 minutos de contato a velocidade de 1,5 m.s⁻¹. O tempo necessário para redução de 5 ciclos log deste microrganismo foi de aproximadamente 9 minutos na utilização do ácido peracético e 10 minutos para o hipoclorito de sódio.

Segundo Hood e Zottola (1997) a comparação entre resultados de estudos de eficiência de sanitizantes é complicada devido a grande variedade nas condições para a aderência e desenvolvimento do biofilme, podendo interferir na ação do agente sanitizante. Fatores como as características microtopográficas das superfícies, como a rugosidade, presença de fissuras ou fendas, diminuem a eficiência do processo de higienização (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008), e interferem diretamente nos resultados obtidos.

Além desses fatores, a ação dos sanitizantes é afetada por tempo e temperatura de contato, pela concentração de uso, pelos tipos de resíduos presentes nas superfícies, tipo e concentração de microrganismos contaminantes, entre outros (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

Embora o hipoclorito de sódio tenha sido considerado menos efetivo no controle de biofilme de *Enterococcus faecium* em aço inoxidável, existem estudos que demonstram sua maior eficiência em outros casos específicos.

Mosteller e Bishop (1993), observaram redução de 3,16; 3,19 e 2,08 ciclos log na contagem de *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* respectivamente aderidas em superfície de teflon, utilizando-se hipoclorito de sódio a 200 mg.L⁻¹. Quando o sanitizante utilizado foi o ácido peracético a 300 mg.L⁻¹ as reduções foram de 2,16; 1,10 e 0,62 respectivamente.

Rossoni e Gaylarde (2000) também observaram maior eficiência na redução dos microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* aderidos em superfície de aço inoxidável, para as concentrações de 100 e 200 mg.L⁻¹ de hipoclorito de sódio, quando comparado as concentrações de 250 e 1000 mg.L⁻¹ de ácido peracético.

Estas diferenças evidenciam a necessidade da utilização do sanitizante adequado a cada processo, o que só é possível a partir do conhecimento de suas propriedades, como a forma de ação, além das características do alimento e dos principais microrganismos envolvidos no processo.

É importante salientar que após a formação do biofilme sua remoção torna-se muito mais complicada, e geralmente só é atingida pela adoção de várias ações combinadas, segundo Jessen e Lammert (2003) dificilmente o uso de um único sanitizante irá removê-lo completamente.

Assim a melhor forma de controle é a preventiva, como a adoção de ferramentas como Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), para que se possa garantir a inocuidade dos alimentos processados.

6 CONCLUSÕES GERAIS

❖ A estirpe de *Enterococcus faecium* 946Ec, isolada de queijo de coalho, apresentou baixa capacidade acidificante, não sendo adequada para utilização como fermento láctico. Mas apresentou baixa atividade proteolítica e capacidade de produção de diacetil, podendo conferir ao queijo características tecnológicas desejáveis e determinantes para sua aceitação pelos consumidores.

❖ É possível a adesão e formação de biofilme por *Enterococcus faecium* 946Ec em aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4 e rugosidade de 0,366 μm , superfície mais utilizada nas indústrias de alimentos, mesmo apresentando baixa rugosidade, o que pode tornar a superfície um constante foco de contaminação.

❖ Os fatores tempo de contato e temperatura de incubação influenciam no processo de adesão e formação de biofilme por *Enterococcus faecium* 946Ec. Os resultados indicaram que abusos no tempo e temperatura de armazenamento sob refrigeração influenciam decisivamente o número de bactérias aderidas, podendo alterar a qualidade de alimentos como o leite.

❖ A microscopia eletrônica de varredura é uma importante ferramenta tanto na avaliação das superfícies que entram em contato com os alimentos quanto na formação de biofilmes bacterianos, pois permite a visualização das microtopografias, evidenciando irregularidades como ranhuras, fissuras e protuberâncias, bactérias aderidas e produção de exopolissacarídeos.

Os sanitizantes hipoclorito de sódio 100 mg.L^{-1} CRT e ácido peracético 300 mg.L^{-1} APA reduziram o biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável em 3,00 e 4,02 ciclos UFC.cm^{-2} respectivamente. Embora o ácido peracético tenha sido considerado o mais eficiente, o microrganismo não foi eliminado nos tratamentos, o que demonstra a dificuldade de sanitização das superfícies após a formação do biofilme. Conseqüentemente as células

remanescentes poderão contaminar os alimentos, como o leite, e por resistirem a temperatura de pasteurização, estarão presentes no produto final.

❖ Os modelos preditivos podem ser uma importante ferramenta no controle da formação de biofilmes, se usados para auxiliar no estabelecimento dos procedimentos de higienização.

REFERÊNCIAS

Aço inox – Especificações técnicas. ACESITA S. A., 2006. Disponível em: www.acesita.com.br, acessado em: 29/10/2008.

ALASRI, A.; ROQUES, C.; MICHEL, G.; CABASSUD, C.; APTEL, P. Bacterial properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n.7, p.635-642, 1992.

ANDRADE, N. J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 1454-1458, 1998.

ANDRADE, N. J.; BASTOS, M. S. R.; FREITAS, L. H.; BERNARDES, P. C. Controle de doenças de origem alimentar no processamento de alimentos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.

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

ANDRADE, N. J.; CARELI, R. T.; MARTINS, A. D. O. Avaliação laboratorial de sanitizantes químicos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.

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

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo (SP): Varela, 2008. 410p.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo(SP): Varela, 2008. 410p.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AWWA – AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WPCF – WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. **Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater**. 16th ed., Washington: American Public Health Association, 1985.

BARANY, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.199-218, 1995.

BERNARDES, P. C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão**. 2008.73f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2008. 73p.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 94f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008. 94p.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº326, de 30 de julho de 1997. **Regulamentos Técnicos sobre Inspeção Sanitária, boas Práticas de Produção/Prestação de Serviços e Padrão de Identidade e qualidade na Área de alimentos**.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. In: MADALENA, F. H.; MATOS, L. L.; HOLANDA JUNIOR, E. V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte (MG): FEPMVZ, 2001, p. 61-74.

CARELI, R. T. **Adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos.** 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 65p. 2005.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas.** 2007. 154f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Campinas (SP), 154p., 2007.

CARVALHO, J. D. G., BRUNO, L. M., NASSU, R. T., LIMA, C. P., VASCONCELOS, N. M., KUAYE, A. Y., Bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanais comercializados em Fortaleza - CE. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.60, n.345, p.221-224, 2005.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da Cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável.** 2004. 186f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Minho, 186p., 2004.

CLONTZ, L. A contaminação microbiana pode causar uma redução de fluxo e corrosão das linhas do sistema de água. **Revista Controle de Contaminação**, n.109, 2008.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICKEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews Microbiology**, v.41, p.435-464, 1987.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SOCOTT, H. M. Microbial Biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, V.49, p.711-745, 1995.

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

DeQUEIROZ, G. A.; DAY, D. F. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.4, p.794-802, 2007.

DOMIG, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W., Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus spp.* **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.147-164, 2003.

DURLU – OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPPOULOU – TZANETAKI, E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.861-870, 2001.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C.; MARCHESAN, M. A.; PÉCORÁ, J. D. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v.13, N.2, p.113-117, 2002.

FIGUEIREDO, H. M., **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. 2000. 85f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 85p., 2000.

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

FLOROS, J. D.; EKANAYAKE, G. P.; ABIDE, G. P.; NELSON, P. E. Optimization of a diced tomato calcification process. **Journal of Food Science**, v.57, p.1144 - 1148, 1992.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.4, p.151-154.

FOUQUIÉ-MORENO; M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. An aspen Publication, 2000. 587p.

FRANS, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Review - Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.1-24, 1999.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H., Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.105-122, 2003.

FREITAS, A. C.; PINTADO, A. E.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Organic acids produced by lactobacilli, enterococci and yeasts isolated from Picante cheese. **European Food Research Technology**, v.209, p.434-438, 1999.

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

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; COGAN, T.M.; CONDON, S.; SWINGS, J. Source of Enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3560-3565, 2002.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT; M., CONDON, S.; SWINGS, L.; COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.177-188, 2001.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, n.2, p.163-171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, V. 88, p. 215-222, 2003.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, p. 668-675, 2008.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p.1165-1171, 2007.

HAEGHEBAERT, S.; LE QUERREC, F.; BOUVET, P.; GALLAY, A.; ESPIÉ, E.; VAILLANT, V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. **Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire**, v.50, p.249-253, 2002.

HAEGHEBAERT, S.; LE QUERREC, F.; VAILLANT, V.; ASTAGNEAU, E. D.; BOUVET, P. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1997. **Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire**, p.177-182, 1998.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3th ed. San Diego: Academic Press Limited, 1998. 532p.

HARTMAN, P. A.; DEIBEL, R. H.; SIEVERDING, L. M. Enterococci. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 676p.

HOLAH, J. T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance-based surface disinfection test food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.255-259, 1990.

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

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and Disinfection in Meat Processing Plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, n.4, p.265-269, 2003.

JOHNSON DIVERSEY. **Divosan Forte – Método de análise da solução de uso**. 2002, 2p.

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V.; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.77-87, 2002.

KITIS, M. Desinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, p.47-55, 2004.

KUNZ, B. **Cultivo de microorganismos para ka produccón de alimentos – Obtención, aplicaciones e investigación**. Zaragoza: Acribia, 1986. 126p.

LATASA, C.; SOLANO, C.; PENADÉS, J. R., LASA, I. Biofilm-associated proteins. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, p. 849-857, 2006.

MACÊDO, J. A. B.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; ARAÚJO, J. M. A.;

SILVA, M. T. C.; JORDÃO, C. P. Formação de Trihalometanos em soluções sanificantes utilizadas no processo de desinfecção de indústrias de alimentação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, n.309, 1999.

MARKS, B. P. Status of microbial modeling in food process models. **Comprehensive Reviews in food Science and Food Safety**, v. 7, n.1, p. 137-143, 2008.

MARQUES, E. B. **Estudo da formação de biofilme em superfícies abióticas: influência de cátions divalentes e ocorrência de determinantes de virulência em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis***. 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 136p., 2004.

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 *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some seleted 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 of General Microbiology**, v.68, p.337-348, 1971.

McMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.395-407, 2002.

MELLO, C. A. **Avaliação da eficiência de sanificantes químicos em condições de uso simulado sobre psicrotróficos acidificantes.** 1997. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG). 62p., 1997.

MORAES, M. S. V.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; PASSOS, F. J. V.; GOMIDE, L. A. M. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, Campinas, 1997.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ALFIERI, P.; BODI, R.; TAMBURINI, A. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Lait**, v.85, p.181-192, 2005.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from North-west italian dairy products. **International Dairy Journal**, v.16, p.867-875, 2006.

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

NASCIMENTO, L. C.; LIMA, L. C. O.; VALLE, R. H. P.; VEIGA, S. M. O. M.; FIORINI, J. E. Uso de derivados clorados, ozônio e ultra-som na sanificação de água e alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 48-57, 2005.

OKAZAKI, M. **Adaptação do método de suspensão para determinação da atividade bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio em concentrações acima de 200 mg/L.** 2003. 96f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 96p., 2003.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, v.19, p. 178-185, 2008.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, A. S.; SOARES, N. F. F. S.; SILVA, A. M. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence

Microscopy and Plate Count Method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.

PEÑA, W E. L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã.** 2005. 355f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência de alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 355p., 2005.

PEREIRA, M. A.; ALVES, A. A.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of a anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 181-186, 2000.

PEREZ, R. M. **Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo de coalho comercializado no município de Campinas, S.P.** 2005. 140f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 140p., 2005.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos.** Campinas: Casa do Pão, 2005. 326p.

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. S.; ANDRADE, N. J.; PENA, W. E. L.; CARELI, R. T.; PIAZZA, J. L.; MINIM, L. A. Modeling the biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite and stainless steel as function of time and temperature. **5th International Conference Predictive Modelling in Foods**, 2007.

ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Review paper – Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.241-64, 1994.

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

SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. **Revista Microbiologia in foco** – Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2007.

SEGANTINI, E.; DANTAS, S. T. Aplicação da microscopia eletrônica de varredura para a avaliação de embalagens. **Informativo CETEA – Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v.8, n.8, 1996.

SIMM, E. M.; ANDRADE, N.J.; MENDONÇA, R. C. S.; PASSOS, F. J. V.; CHAVES, J. B. P. Interferência de substâncias orgânicas e esporos de *Bacillus subtilis* na medida de ATP-bioluminescência. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.4, p.305-310, 2006.

SOUTO, L. I. M. **Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil**. 2006. 85f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 85p., 2006.

SOUTO, L. I. M.; GARBULHO, M. A.; GONÇALVES, F.; MERSEGUEL, C. E. B.; MINAGAWA, C. Y.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Contagem de *Enterococcus* spp. de leite cru coletado em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, Brasil. **Anais do Congresso Brasileiro de Microbiologia**, v. 23, 2005.

SPINELLI, A. C. N. F. **Influência das diferentes temperaturas de estocagem na sobrevivência de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco de laranja tratado por enchimento a quente**. 2006. 164f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 164p., 2006.

SREBERNICH, S. M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.744-750, 2007.

STONE, L. S.; ZOTTOLLA, E. A. Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and its attachment to stainless steel. **Journal of Food Science**, v.50, p. 957-960, 1985.

SURDEAU, N.; MAQUIN-LAURENT, D.; BOUTHORS, S.; GELLÉ, M. P. Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent Oxsil[®] 320N. **Journal of Hospital Infection**, v.62, n.4, p.487-493, 2006.

SUZZI, G.; CARUSO, M.; LOMBARDI, A.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E.; ANDRIGHETTO, C.; LANORTE, M. T. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p.267-274, 2000.

TELGSMANN, U.; HORN, H.; MORGENROTH, E. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. **Water Research**, v.38, p. 3671-3684, 2004.

The Microbial World – The Normal Flora of Humans. 2006. Disponível em: www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/NormalFlora.html acessado em: 20/08/2008.

TIMELLI, S.; ANAR, S.; SEN, C.; AKYUVA, P. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. **Food Control**, v,17, p. 856-861, 2006.

TROLLER, J. A. **Sanitation in Food Processing**. 2th Ed. Academic Press, 1993. 456p.

VANETTI, C. A.; CEOTTO FILHO, G.; ALVES, E.; ANDRADE, N. J. Técnicas em microscopia usadas no estudo da adesão e da formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos – Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo (SP): Varela, 2008. 400p.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de Quorum Sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotóficas isoladas de leite**. 2006. 176f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 176 p., 2006.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview – Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 2675-2679, 2000.

WHITING, R. C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.6, p.464-494, 1995.

WESTALL, F.; WALSH, M.; TOPORSKI, J.; STEELE, A. Fossil biofilms and the search for life on mars. In: KRUMBEIN, W. E.; PATERSON, D. M.; ZAVARZIN, G. A. **Fossil and Recent Biofilms – A Natural History of Life on Earth**. Kluwer Academic Publishers, 2003. 504p.

ZOBELL, C.E. The Effect of Solid Surfaces Upon Bacterial Activity. **Journal of Bacteriology**, v.46, p.39-56, 1943.

ZOTTOLA, E. A. Special techniques for studying microbial biofilms in food systems. In: TORTORELLO, M. L.; GENDEL, S. M. **Food Microbiological Analysis – New Technologies**. CRC Press, 1997. 376p.

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