

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE BIOCIDAS EM
BIOFILMES FORMADOS A PARTIR DE FLUIDO DE
CORTE UTILIZADO NA USINAGEM DE METAIS”**

Autora: Raquel Vannucci Capelletti

RA: 028294

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes

Co-orientadora: Dr^a. Sílvia Yuko Eguchi

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas, maio de 2006.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

C172a Capelletti, Raquel Vannucci
Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes
formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem
de metais / Raquel Vannucci Capelletti.--Campinas, SP:
[s.n.], 2006.

Orientadores: Ângela Maria Moraes, Silvia Yuko Eguchi
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biofilme. 2. Microorganismos – Efeitos dos
antibióticos. 3. Testes de sensibilidade bacteriana. 4.
Fluidos de corte. I. Moraes, Ângela Maria. II. Eguchi,
Silvia Yuko. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Evaluation of biocide activity on biofilms formed in
cutting fluid employed in metalworking industry

Palavras-chave em Inglês: Biofilm, Biocide, Cutting fluid, Metalworking
industry, in vitro experiments; MBEC™ device

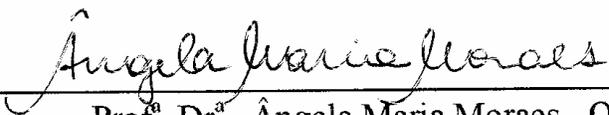
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

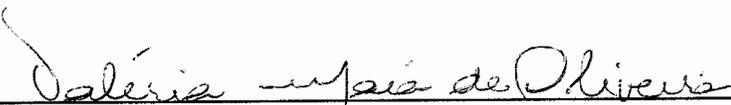
Banca examinadora: Cristiana Maria Pedroso Yoshida, Fumio Yokoya,
Valéria Maia de Oliveira

Data da defesa: 23/05/2006

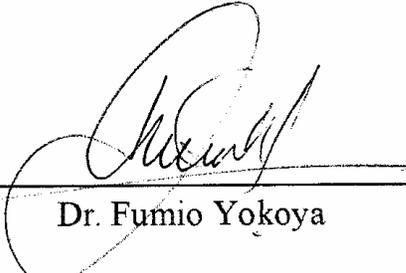
Dissertação de Mestrado defendida por Raquel Vannucci Capelletti e aprovada em 23 de maio de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:


Prof.^a Dr.^a. Ângela Maria Moraes - Orientadora

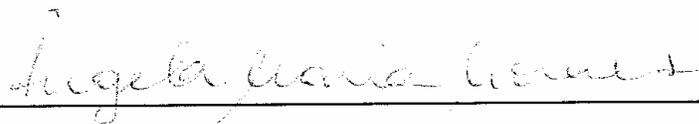

Dr.^a. Sílvia Yuko Eguchi – Co-orientadora


Dra. Valéria Maia de Oliveira


Dr.^a. Cristiana Maria Pedroso Yoshida


Dr. Fumio Yokoya

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, defendida por Raquel Vannucci Capelletti, e aprovada pela comissão julgadora, em maio de 2006.



Prof.^ª. Dr.^ª. Ângela Maria Moraes

Orientadora



Dra. Silvia Yuko Eguchi

Co-orientadora

EPÍGRAFE

“A verdadeira viagem de descoberta não consiste em sair à procura de novas paisagens, mas em possuir novos olhos”.

Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Ana Elisa, meu pai Laércio e meus irmãos Gustavo e Renata, que me apoiaram durante todo o período antecedente à finalização desta dissertação de mestrado.

À orientação da professora Dra. Ângela e Dra. Sílvia, fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Aos diretores da empresa em que atuo, Sr. Walter Piccirillo e Sr. Roberto Dacorso (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda.), que me incentivaram e forneceram o financiamento experimental, essencial à realização deste estudo. Ao apoio técnico oferecido pelo Sr. Walter Oliveira, Sr. Ademar e Giovanni, que foram de grande importância para as pesquisas de campo. À Eliane Gama Lucchesi, por permitir a realização dos ensaios para este trabalho, em paralelo às minhas atividades profissionais. À colaboração e incentivo de meus companheiros de trabalho, Thiago, Sílvia, Fábio e Emerson.

A todas as empresas clientes da IPEL que gentilmente cederam suas amostras para o presente estudo.

Por fim, dedico este trabalho a Fernando Zago, que me ajudou a sonhar e a realizar meus sonhos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES.....	<i>i</i>
RESUMO.....	<i>ii</i>
ABSTRACT.....	<i>iii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	01
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	07
2.1- Formas de vida planctônica e sésil dos microrganismos.....	07
2.2- Biofilmes microbianos.....	07
2.3- Biocidas e estratégias de controle microbiológico industrial.....	11
2.4- Fluidos de corte.....	14
2.5-Recuperação microbiana efetiva em amostras industriais contaminadas.....	17
2.6- Sistemas de ensaio para a formação e erradicação de biofilmes.....	18
2.7- Tendências no estudo de biofilmes.....	22
3- METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	23
3.1- Material.....	23
3.1.1- Amostras.....	23
3.1.2- Microrganismos.....	23
3.1.3- Soluções.....	24

3.1.4- Meios de cultura.....	24
3.1.5- Biocidas.....	25
3.1.6- Aparatos.....	26
3.1.7- Equipamentos.....	26
3.2- Métodos.....	27
3.2.1- Avaliação de diluentes para a recuperação de microrganismos em amostras contaminadas.....	27
3.2.2- Identificação de grupos microbianos em fluidos de corte de diversas origens.....	27
3.2.3- Caracterização físico-química e microbiológica do fluido de corte em estudo.....	28
3.2.4- Isolamento e caracterização dos contaminantes planctônicos aeróbios do fluido de corte.....	28
3.2.5- Teste de susceptibilidade para determinação da MIC e da MMC.....	29
3.2.6- Avaliação da eficácia de preservação com diferentes biocidas na emulsão contaminada.....	30
3.2.7- Desenvolvimento de biofilmes no dispositivo MBEC™.....	31
3.2.7.1- Preparo do inóculo.....	31
3.2.7.2 Formação do biofilme.....	32
3.2.7.3- Avaliação da influência dos tempos de formação e de sonicação do biofilme.....	32

3.2.8- Teste de susceptibilidade para determinação da MBEC.....	33
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	
4.1- Seleção do diluente para recuperação celular.....	35
4.2- Grupos de microrganismos predominantes em fluidos de corte mineral	38
4.3- Caracterização do fluido de corte amostrado	41
4.4- Contaminantes planctônicos aeróbios na amostra	42
4.5- Concentrações inibitória mínima e de morte das células planctônicas	45
4.6- Preservação da emulsão após subseqüentes contaminações.....	47
4.7- Formação de biofilmes no sistema MBEC™.....	49
4.7.1- Avaliação da adequação do inóculo.....	49
4.7.1.1- Inoculação com a amostra contaminada.....	49
4.7.1.2- Inoculação com a suspensão contendo os microrganismos isolados.....	51
4.7.2- Períodos de formação e de sonicação do biofilme.....	53
4.8- Comparação da concentração mínima de biocidas para erradicação do biofilme.....	56
4.9- Comparação da susceptibilidade de células planctônicas e sésseis aos biocidas.....	62
4.10- Discussão global dos resultados obtidos para a adequação da metodologia proposta.....	63

5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	66
5.1- Conclusões.....	66
5.2- Sugestões.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	77
A.1 Fórmulas estruturais dos princípios ativos dos biocidas.....	77
A.2 Formulação dos meios de cultura.....	78
A.3 Escala de McFarland.....	81

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

Figura 1: Biofilmes formados em uma indústria de usinagem de metais localizada no estado de São Paulo.....	03
Figura 2: Dispositivo MBEC™.....	04
Figura 3: Etapas de formação dos biofilmes.....	09
Figura 4: Circuito do fluido de corte na indústria.....	15
Figura 5: Análise microbiológica em amostras de fluido de corte mineral.....	39
Figura 6: Padrão dos resultados para o teste de degradação de hidrocarboneto.....	44
Figura 7: Cinética de formação do biofilme no dispositivo MBEC™, com amostra de fluido de corte contaminada (inóculo 1).....	50
Figura 8: Cinética de formação do biofilme no dispositivo MBEC™, com os microrganismos isolados (inóculo 2).....	53
Figura 9: Avaliação comparativa entre os biofilmes formados nos pinos do dispositivo MBEC™, após 24 horas e 48 horas de incubação.....	54

Tabelas

Tabela 1: Biocidas não oxidantes freqüentemente usados no controle de contaminações em sistemas de fluido de corte e seu princípio de ação.....	12
Tabela 2: Efetividade microbiológica conhecida dos biocidas mais utilizados no segmento industrial de usinagem de metais.....	13
Tabela 3: Comparação entre sistemas de ensaio para o desenvolvimento de biofilmes.....	20
Tabela 4: Comparação entre MMC e MBEC para vários biocidas e diferentes tempos de contato com biofilme de <i>Mycobacterium phlei</i> formado no dispositivo MBEC™.....	20
Tabela 5: Descrição dos biocidas utilizados.....	25
Tabela 6: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 1 (duas amostras de aditivo para concreto).....	35
Tabela 7: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 2 (seis amostras de pasta de carbonato de cálcio).....	36
Tabela 8: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 3 (duas amostras de cola branca escolar e uma de tinta guache).....	36
Tabela 9: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 4 (duas amostras de detergente doméstico).....	37
Tabela 10: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 5 (cinco amostras de fluido de corte).....	37
Tabela 11: Propriedades dos fluidos de corte sem contaminação e contaminado.....	41
Tabela 12: Cepas aeróbias isoladas na amostra de fluido de corte contaminado.....	43

Tabela 13: Determinação da MIC e da CMM para os contaminantes planctônicos da amostra de fluido de corte.....	46
Tabela 14: Contagem microbiana das amostras com diferentes biocidas a cada intervalo de ensaio.....	48
Tabela 15: Microbiota presente nos pinos do dispositivo MBEC™.....	51
Tabela 16: Adesão celular em diferentes tempos de incubação do inóculo, obtida pela recuperação das células aderidas por sonicação.....	56
Tabela 17: Susceptibilidade dos biofilmes formados com o inóculo 1.....	59
Tabela 18: Susceptibilidade dos biofilmes formados com o inóculo 1 diluído a 1%..	59
Tabela 19: Determinação da MBEC para o biofilme formado a partir do inóculo 1 e a partir do mesmo diluído a 1%.....	60
Tabela 20: Erradicação do biofilme formado a partir do inóculo 1, ensaiado a 25±2°C.....	62
Tabela 21: Resultados comparativos entre o desempenho dos biocidas testados no biofilme formado a partir do inóculo 1.....	63
Tabela 22: Efeito das variáveis envolvidas nas etapas de ensaio para a formação e erradicação de biofilmes a partir de fluido de corte.....	64

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

MBEC™	Dispositivo para determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme.
MBEC	<i>Minimal Biofilm Concentration</i> Concentração mínima de agente antimicrobiano para erradicação de células sésseis (biofilme).
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> Concentração mínima de agente antimicrobiano que inibe o desenvolvimento das células livres (planctônicas).
MMC	<i>Minimal Microbicidal Concentration</i> Concentração mínima de agente antimicrobiano que ocasiona morte das células planctônicas.
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i> Matriz extracelular, produzida principalmente por microrganismos aderidos a superfícies (biofilme).
UFC	Unidade formadora de colônia Número de colônias obtidas em contagem microbiana convencional (semeadura em placas). Geralmente é expressa em UFC/mL ou UFC/g e, quando do uso do sistema MBEC™, é expressa em UFC/pino.

RESUMO

Biofilmes são associações de espécies microbianas interdependentes, funcionando de forma complexa e coordenada como mecanismo de colonização de superfícies. Quando indesejavelmente instalados em uma planta industrial, os biofilmes contribuem para a contaminação de muitas áreas de processo, pois representam fontes de liberação e disseminação de microrganismos que podem deteriorar produtos, causando prejuízos financeiros e retrabalho, situação esta que pode ser prevenida e/ou controlada. No entanto, sua remoção representa um desafio, principalmente no que diz respeito à determinação do tipo e da dosagem adequada de biocida para este fim. Frequentemente, a abordagem para a resolução deste problema é empírica.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo reprodutível para a formação de biofilmes em laboratório a partir de consórcios microbianos e a avaliação de sua susceptibilidade aos biocidas mais recomendados. Foram utilizados como inóculo microrganismos presentes em fluido de corte proveniente da indústria de usinagem de metais, por ser este um dos principais segmentos industriais sujeitos à formação de biofilmes. A metodologia adotada foi a recomendada para a utilização do dispositivo MBEC™, um aparato amplamente empregado nas áreas médica e odontológica para o estudo de patógenos isolados, enfocando-se no estudo a influência de variáveis como tipo e concentração do inóculo, tempo e temperatura de incubação para a obtenção do biofilme e tempo de sonicação para desagregação do biofilme.

Os resultados obtidos mostraram que o procedimento estabelecido para a obtenção *in vitro* de biofilmes foi plenamente satisfatório utilizando o inóculo constituído do fluido contaminado, e que tais biofilmes foram eficientemente erradicados na presença de biocidas não-oxidantes em concentrações 12 vezes superiores às normalmente empregadas. A temperatura de 25 ou 35°C e período de 48 h de incubação devem ser empregados para o desenvolvimento do biofilme e, para sua desagregação, recomenda-se efetuar a sonicação por 30 minutos. O isolamento das culturas puras a partir do consórcio microbiano original da amostra de fluido de corte, e o estudo dos biofilmes formados a partir das cepas isoladas não resultou na formação de biofilmes com número suficiente de células aderidas, indicando a ocorrência de seleção de cepas sem grande capacidade de adesão e de cepas fastidiosas e até mesmo não-cultiváveis, que requerem condições especiais de cultivo e que são essenciais para corresponder à flora original da amostra na formação do biofilme.

Palavras-chave: biofilme, microrganismos, biocidas, testes de sensibilidade bacteriana, fluidos de corte industrial, dispositivo MBEC™.

ABSTRACT

Biofilms are complex structures consisting of interdependent microbial species associations acting as surface colonization mechanism. Once undesirably installed at an industrial plant, biofilms contribute to contaminate many process areas, because they represent sources of microbial release and dissemination, which can deteriorate products, causing financial damages and work reboing, undesirable situations that can be controlled and/or prevented. However, biofilm removal represents a challenge, mainly referring to biocide type and dosage selection. Frequently, empiric approaches are used to solve this problem.

The aim of the present work was to develop an *in vitro* experimental protocol for biofilm formation employing microbial consortia and to evaluate its susceptibility to recommended biocides. Microorganisms contaminating cutting fluid used in metalworking industry were employed as inoculum, since this is one of the main industrial segments subject to frequent biofilm formation. The adopted methodology was the recommended for the use of the MBEC™ device thoroughly employed in the medical and dentistry areas for the study of isolated pathogenic microorganisms, and the study of the influence of variables such as inoculum type and concentration, incubation time and temperature for biofilm development, and sonication time for disaggregating the biofilms were focused.

The achieved results showed that the established procedure for *in vitro* biofilm development was fully satisfactory when using the inoculum consisting of contaminated cutting fluid and that these biofilms were efficiently eradicated using non-oxidant biocide concentrations twelve times superior to those usually employed. Incubation temperature of 25 or 35°C and 48 h time period should be employed for biofilm development, while a 30 minute sonication period is recommended for disaggregating the biofilm. The isolation of the microorganisms in consortium, in the same cutting fluid, and their use for biofilm formation resulted in insufficient adhered cell numbers, indicating the occurrence of unadherent cells as well as unculturable strains, which require special culture conditions, and are essential for to reflect the original flora in the biofilm formation.

Key-words: biofilm, microorganisms, biocides, *in vitro* bacterial experiments, cutting fluid, metalworking industry, MBEC™ device.

1- INTRODUÇÃO

Entre as formas de vida dos microrganismos (em suspensão – denominada planctônica; e agregada a superfícies – sésil ou em biofilme) observam-se peculiaridades que as diferem quanto à velocidade de crescimento, estrutura e composição da membrana celular, e sensibilidade a agentes antimicrobianos. Geralmente, a forma sésil apresenta alterações genéticas que possibilitam a inibição ou síntese de novas substâncias, além de uma estrutura protetora do grupo microbiano contra fatores ambientais agressivos. Assim, tais características proporcionam a estas células condições favoráveis de sobrevivência, o que as torna menos susceptíveis à erradicação quando comparadas aos mesmos microrganismos sob a forma planctônica (Morck *et al.*, 2001).

Biofilmes são constituídos por microrganismos, material polimérico extracelular (polissacarídeos, proteínas, lipídeos) e resíduos do ambiente colonizado, e suas atividades podem ser classificadas em duas grandes categorias: as desejáveis, conduzindo a transformações de valor positivo, e as prejudiciais, responsáveis por processos que devem ser evitados devido a suas conseqüências negativas que justificam, do ponto de vista prático, o estudo do problema. Se utilizados de maneira controlada, os biofilmes podem ser benéficos (Arcuri, 2000), como por exemplo, na indústria de alimentos para a produção de fermentados, no tratamento de efluentes e de água potável, assim como na produção de biopolímeros para usos diversos. Porém, freqüentemente, os biofilmes são relacionados a diversos problemas tais como o processo de corrosão microbiologicamente induzido em tubulações, equipamentos e peças metálicas (Walker *et al.*, 1998), contaminação em indústrias de alimentos e em sistemas de água (Flint *et al.*, 1997), doenças periodontais (Hobson e Bolsen, 2001) e infecções hospitalares relacionadas a biomateriais (Dankert *et al.*, 1986).

Em indústrias, tubulações e demais circuitos de fluido são altamente favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos e a formação de biofilmes tem comum ocorrência, destacando-se indústrias atuantes em áreas como as de produção de tintas, colas, domissanitários, aditivos para concreto e uso de fluido de corte.

Inevitavelmente, estes locais são de difícil acesso à limpeza e a inspeção visual para a averiguação da instalação dos biofilmes tem baixa eficácia, pois a maioria dos agregados microbianos apresenta espessura da ordem de micrômetros. O agravamento

econômico gerado pela freqüente presença dos biofilmes nas indústrias resulta do acréscimo de despesas com limpeza, manutenção, substituição precoce do fluido e de equipamentos, além de problemas no controle de qualidade dos produtos (Christensen e Characklis, 1990).

Porém, os biofilmes podem ser investigados para a prevenção de sua formação, controle ou erradicação, e a utilização de biocidas é freqüentemente considerada. O uso destes, portanto, é de grande importância e requer minuciosa determinação quanto à concentração apropriada para aplicação. Dosagens abaixo do nível necessário causam falsa segurança, seleção de microrganismos e, conseqüentemente a ocorrência de surtos de contaminação, enquanto que, acima do necessário, além dos aspectos econômicos, há a problemática de toxicidade ocupacional entre os envolvidos com a manipulação do produto.

Devido a estes fatos, a determinação da concentração inibitória mínima dos contaminantes planctônicos, MIC (Hobson e Bolsen, 2001), e da concentração mínima de erradicação do biofilme, MBEC (Ceri *et al.*, 2001), é essencial para o monitoramento e controle do processo, sob o aspecto microbiológico. Na maioria dos casos observados na prática laboratorial, a definição do tratamento baseada nos resultados do teste de MIC não é efetiva, fazendo-se valer o fato da inerente resistência aos biocidas apresentada pelos biofilmes (Morck *et al.*, 2001). Esta prática expõe os microrganismos presentes no biofilme a uma subdosagem, insuficiente para sua eliminação, o que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência a estes produtos.

O segmento industrial sob estudo neste trabalho utiliza fluidos de corte como material em fluxo, cuja composição é óleo e água, para lubrificação e refrigeração durante o corte de peças metálicas (usinagem). Os fluidos de corte são classificados, conforme sua origem, em quatro tipos: óleo vegetal, mineral, sintético e semi-sintético (Runge e Duarte, 1989).

O que induz à análise de problemas microbiológicos neste segmento industrial, principalmente em relação aos biofilmes, é o fato de que há a recirculação e reaproveitamento do fluido durante meses, e os locais por onde este percorre (equipamentos e canaletas) propiciam a deposição de materiais e resíduos deste ambiente, facilitadores da instalação de biofilmes pelos contaminantes do fluido em uso, conforme exemplificado na Figura 1.

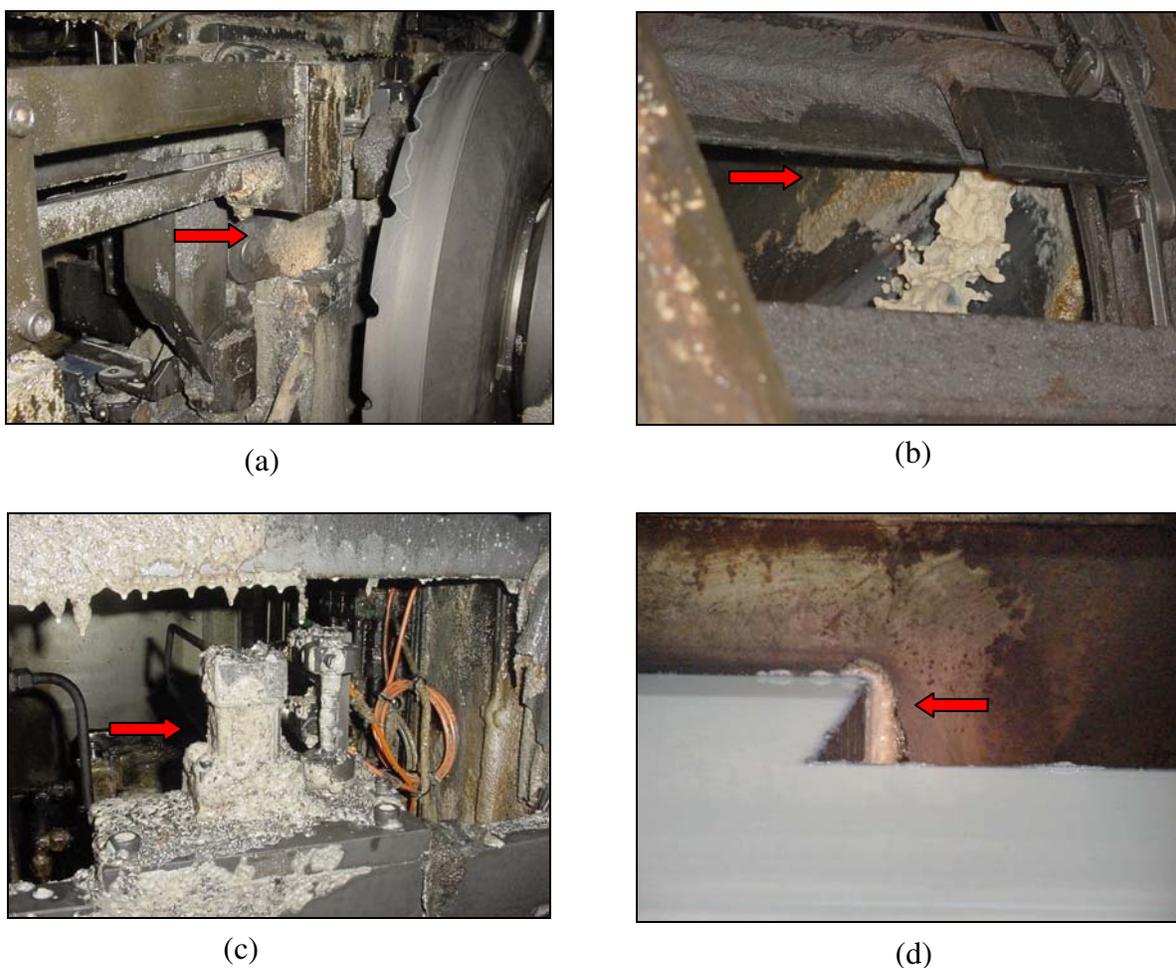


Figura 1: Biofilmes formados em uma indústria de usinagem de metais localizada no estado de São Paulo. (a) sistema de engrenagens; (b) canaleta com emulsão em fluxo; (c) sensor para corte de peças; (d) tanque central da emulsão.

Dentre os problemas decorrentes da contaminação por biofilmes neste segmento industrial, podem ser citadas, principalmente, alterações nas propriedades originais do fluido (aumento da viscosidade, desestabilização da emulsão, perda da capacidade de lubrificação e refrigeração), deterioração de equipamentos e problemas relacionados à saúde ocupacional dos manipuladores do produto, sendo as infecções dermatológicas e respiratórias bastante recorrentes. Com isto, o período de utilização do fluido é reduzido e procedimentos legais devem ser providenciados quando o descarte é inevitável, envolvendo a contratação de empresas especializadas e aprovadas por órgão competente para o destino final do mesmo (Runge e Duarte, 1989). Devido ao fato de que a geração de óleo é prejudicial ao meio ambiente, formuladores de fluidos lubrificantes vêm se preocupando

com a obtenção de produtos com maior vida útil. A aditivação com biocidas, então, torna-se imprescindível para garantir esta utilização a longo prazo, com a definição do produto e dosagem dependentes do tipo e grau de contaminação no sistema.

Neste contexto, o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de analisar o crescimento microbiológico no fluido em uso (células planctônicas) é de suma importância, tendo em vista proporcionar melhor compreensão dos contaminantes que ali proliferam e estudá-los em relação à sua capacidade de adesão para prevenir, controlar e/ou erradicar potenciais formadores de biofilme para otimizar o processo industrial. O fluido de corte estudado submetido à formação de biofilme *in vitro* foi do tipo mineral, por ser o mais utilizado no segmento visado, apresentando uma relação custo/benefício mais atraente em comparação aos demais tipos de fluidos disponíveis.

Para o desenvolvimento do protocolo de ensaio foi utilizado o dispositivo MBEC™ (Figura 2), disponível comercialmente, que foi elaborado para atender às necessidades da área médica no controle de infecções hospitalares.

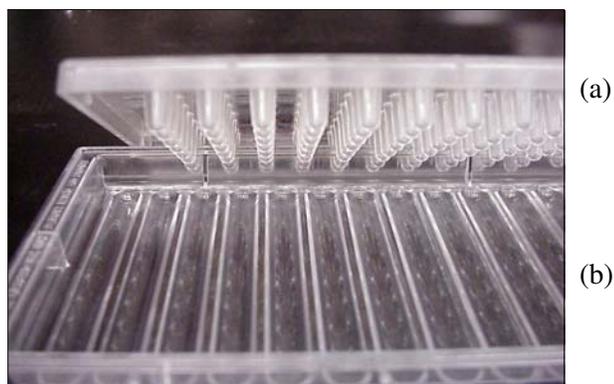


Figura 2: Dispositivo MBEC™ (a) tampa com 96 pinos, dispostos em 8 fileiras verticais codificadas de A a H, e 12 fileiras horizontais codificadas de 1 a 12; (b) base com canais interligados (MBEC Bioproducts Incorporation, 2005).

Trata-se de um sistema de ensaio para a formação e erradicação de biofilmes em laboratório, oferecendo a facilidade de desenvolver múltiplos e equivalentes biofilmes sobre os corpos de prova, e que permite realizar testes de susceptibilidade a vários biocidas simultaneamente no mesmo aparato (Ceri *et al.*, 2001).

Assim, o objetivo global deste trabalho foi promover adaptações da metodologia para a formação e erradicação de biofilmes, de forma a atender às necessidades industriais, utilizando o dispositivo MBEC™ e fluido de corte proveniente de um ambiente contaminado por biofilmes. Para tal, foram efetuados estudos enfocando separadamente as células planctônicas e as sésseis. As etapas envolvidas na busca do objetivo global estabelecido foram:

- 1) o estudo dos contaminantes da amostra (células planctônicas), compreendendo:
 - a avaliação do diluente mais apropriado para a recuperação de microrganismos;
 - o isolamento dos contaminantes planctônicos;
 - a análise da susceptibilidade a biocidas (erradicação);
 - a avaliação da eficácia de preservação com diferentes biocidas na emulsão contaminada.

- 2) no estudo dos contaminantes da amostra sob a forma fixa (células sésseis/biofilme):
 - análise do efeito da variação do tipo e da concentração do inóculo inicial: amostra original com alta concentração microbiana, amostra original diluída, e suspensão contendo os microrganismos isolados;
 - determinação da influência do tempo de incubação para a formação do biofilme e do período de sonicação para a determinação de sua concentração celular;
 - o efeito da alteração da temperatura do ensaio;
 - a análise da susceptibilidade a biocidas.

Destaca-se que os resultados de erradicação das células planctônicas para cada tipo de biocida foram comparados aos determinados para as células sésseis, visando auxiliar as indústrias de usinagem de metais a minimizar os prejuízos oriundos da contaminação microbiana utilizando adequadamente os biocidas (medidas preventivas e corretivas). Além disto, tais resultados serão de grande importância para evitar problemas de ordem intrínseca, como a resistência dos microrganismos a tratamentos inadequados.

É importante ressaltar também que durante o desenvolvimento do trabalho, a empresa nacional IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda., formuladora de biocidas, gentilmente disponibilizou apoio financeiro e técnico (dependências laboratoriais e equipamentos). O segmento de usinagem de metais representa grande parcela dentre os

clientes desta empresa, apresentando no ano de 2005 um crescimento de 57% no consumo de biocidas em comparação ao mesmo período (janeiro a maio) de 2004. Pelo histórico do laboratório de microbiologia da empresa, constata-se que 30% dos casos sob análise, para tratamento e controle de contaminação, estão relacionados a problemas causados por biofilmes, sendo 35% deste total referentes ao segmento de mercado abordado no presente estudo.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Formas de vida planctônica e sésil dos microrganismos

Com o desenvolvimento de métodos para a produção de meios nutrientes sólidos e da habilidade para isolar culturas de microrganismos por Robert Koch nas últimas décadas do século XIX, o treinamento de gerações de microbiologistas foi baseado na investigação e elucidação das propriedades de culturas puras de microrganismos. Em 1943, porém, Zobell observou que a colonização bacteriana em superfícies constituía influência positiva na atividade das células em relação à sua forma isolada e não aderida, amplamente estudada. Empregando técnicas de microscopia mais sofisticadas e efetivas, Costerton *et al.* (1978) verificaram que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontrava fixa a suportes, e não em forma dispersa em suspensão. Aos microrganismos aderidos foi atribuído o nome de biofilme, composto por células microbianas de fisiologia diferenciada, chamadas sésseis. Os microrganismos precursores da formação de biofilmes, denominados planctônicos, são encontrados em suspensão, o que os torna mais susceptíveis a agressões ambientais que em sua forma sésil. Apesar disto, os microrganismos planctônicos foram, durante muitos anos, referência para a seleção de agentes antimicrobianos.

A partir de então, o conceito de biofilme avançou e pesquisas vêm sendo realizadas em muitas áreas relacionadas com a ecologia microbiana. A microbiologia moderna, portanto, se preocupa em estudar os mecanismos fisiológicos e de controle entre as formas microbianas planctônica (livre) e sésil (biofilme).

2.2- Biofilmes microbianos

Quando fixos a um suporte, os microrganismos se agregam em biofilmes, que lhes conferem a capacidade para estabelecer-se em variados locais e em inóspitas condições nutricionais, além de facilitar a comunicação intercelular através de moléculas sinalizadoras (Vieira, 1995). A estrutura unificadora e protetora dos biofilmes é denominada matriz

extracelular (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*), de composição heterogênea e complexa. Ainda que, de uma maneira geral, sejam os polissacarídeos a prevalecer (Wimpenney *et al.*, 1993), a EPS pode também ser constituída por proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios. Em estudos mais recentes, com biofilmes de *Pseudomonas putida*, Jahn *et al.* (1999) mostram que as proteínas representam a maior fração da EPS, podendo ser de até 75% em relação à sua massa seca total.

A complexidade da composição e estrutura dos biofilmes, além da dificuldade em avaliar diretamente os microrganismos em seu habitat natural, exemplificam razões pelas quais os biofilmes apresentam estágio fisiológico pouco estudado; porém, sabe-se que a expressão de genes pode diferir em até 30% entre culturas planctônicas e sésseis, sendo de 20 a 30% dos genomas bacterianos seqüenciados de função desconhecida (Marques *et al.*, 2004). Tais diferenças induzem à melhor compreensão do comportamento microbiano quando associado a outros gêneros e espécies. Os biofilmes, portanto, podem ser tratados como uma nova forma de vida que merece enfoque diferenciado em relação à abordagem adotada pela microbiologia tradicional.

Os biofilmes são formados a partir de uma seqüência de eventos, de acordo com as etapas de adesão e de adaptação dos microrganismos ao suporte, conforme ilustrado esquematicamente na Figura 3.

A primeira etapa envolvida na formação de um biofilme, a adesão dos colonizadores primários, é fundamentalmente controlada por interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionador que se forma a partir de resíduos do próprio ambiente. Apêndices celulares externos, como flagelos, fímbrias e pílilis também desempenham papel importante na adesão celular inicial, além de formarem pontes entre as células e a superfície (Christensen e Characklis, 1990).

A adesão irreversível é quase sempre mediada pelos polímeros extracelulares. Após o contato com a superfície e a instalação microbiana, a fase de crescimento e divisão celular ocorrem. Assim, se dá a formação de material extracelular (biofilme propriamente dito) fazendo com que as ligações entre as células e a superfície se fortaleçam. A partir de então, dentro de dias a meses, a adesão de outros microrganismos é facilitada, e ocorre a liberação de novos colonizadores que se desprendem do biofilme maduro. Os microrganismos liberados formarão novos biofilmes, caracterizando um ciclo de contaminações (Christensen e Characklis, 1990).

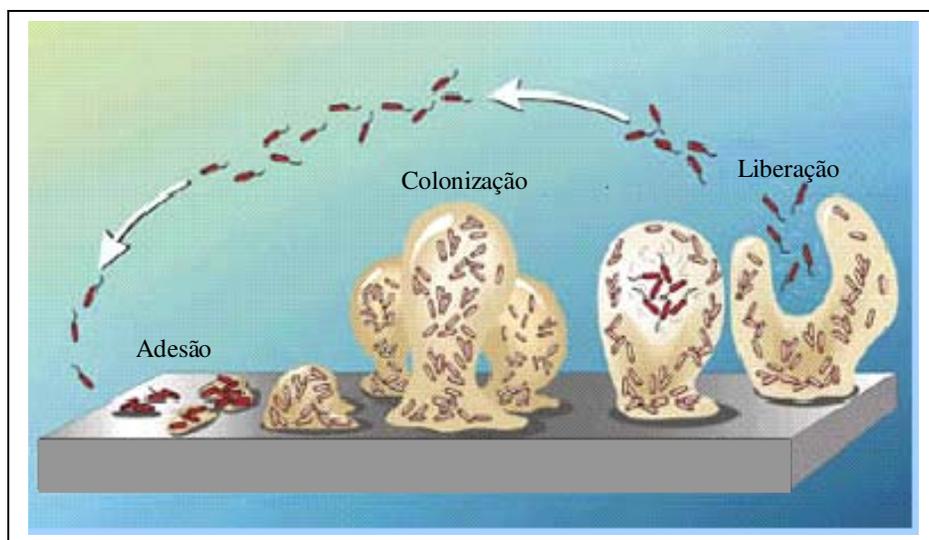


Figura 3: Etapas de formação dos biofilmes (adaptada de Dirckx e Davies, 2006).

Curiosamente, sabe-se que ligas de cobre, como o latão, são relativamente tóxicas aos microrganismos devido à presença do íon cúprico. Entretanto, o caráter aniônico de muitos polissacarídeos presentes nos biofilmes aderidos a superfícies metálicas propicia o aprisionamento deste e de outros cátions, diminuindo sua concentração naquele ecossistema. Assim, a ação tóxica de certos materiais é reduzida e a colonização microbiana torna-se facilitada nestas superfícies, ocasionando alterações das condições eletroquímicas na interface metal/solução, e a aceleração e intensificação do processo corrosivo (Christensen e Characklis, 1990).

Dentre todos os microrganismos, são as bactérias que, em condições favoráveis, mais frequentemente produzem biofilme, ainda que algumas apresentem, naturalmente, uma maior aptidão que outras. Seus reduzidos tamanhos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante são as principais características que as tornam excelentes organismos capazes de colonizar qualquer superfície, até mesmo em condições extremas (Christensen e Characklis, 1990). *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* são gêneros de bactérias frequentemente encontrados em biofilmes (Mattila-Sandholm e Wirtanem, 1992).

O tipo e a disponibilidade dos substratos que servem de fonte de energia e de nutrientes aos componentes do biofilme, e as condições físico-químicas do meio circundante são tidos como fatores que podem afetar o crescimento microbiano nos ecossistemas naturais e artificiais. Esses influenciam a proliferação de determinados microrganismos, contribuem para o desfecho da competição entre as diferentes espécies e, conseqüentemente, para a determinação das características das comunidades microbianas. Uma avaliação detalhada acerca desses fatores foi realizada por Vieira (1995), que, em laboratório, verificou a formação de biofilmes em diversas condições induzidas, fazendo crer que tais circunstâncias podem retardar o processo, mas dificilmente a inibição total de sua formação é atingida.

A prevenção do desenvolvimento de biofilmes é especialmente importante, pois é atualmente constatado e aceito que os microrganismos que o constituem são de difícil erradicação. Tal fato é, em parte, atribuído à matriz extracelular, por esta funcionar como uma barreira protetora contra fatores agressivos externos (Christensen e Characklis, 1990), dificultando o transporte do agente antimicrobiano até as células. De acordo com Heinzl (1998), microrganismos residentes em biofilmes protegem-se também dos efeitos tóxicos dos biocidas por sua inativação através de enzimas e de outros metabólitos que degradam ou neutralizam tais produtos, o que acarreta uma redução da quantidade de biocida disponível para atuar nos microrganismos. Não obstante, a menor eficiência dos processos de controle na formação de biofilmes freqüentemente é atribuída, com imprecisão, exclusivamente ao desenvolvimento de resistência microbiológica, quando muitas vezes a causa do problema pode estar vinculada à inadequada aplicação dos biocidas.

A resistência intrínseca dos biofilmes a biocidas é claramente demonstrada em diversos estudos realizados, como os efetuados com células não aderidas de *Listeria monocytogenes*, em que as mesmas foram eliminadas após 30 segundos de contato com o sanitizante cloreto de benzalcônio, enquanto as células aderidas resistiram ao mesmo sanitizante por 20 minutos (Frank e Kofi, 1990). Outros microrganismos, como *Pseudomonas fluorescens* e *Yersinia enterocolitica*, quando na presença de hipoclorito de sódio, sofreram cinco reduções decimais quando em suspensão, mas as células aderidas alcançaram valores máximos de 3,2 reduções decimais (Mosteller e Bishop, 1993).

2.3- Biocidas e estratégias de controle microbiológico industrial

Biocida pode ser definido como qualquer substância que contém um ou mais agentes ativos, capaz de prevenir, inibir, diminuir ou eliminar a ação de organismos vivos patogênicos e não patogênicos (definição adaptada da *European Commission*, 1998). No presente estudo, foram tratados como biocidas as substâncias que têm atividade contra os microrganismos encontrados no ambiente industrial.

Para exercerem sua função, os biocidas agem nos componentes celulares funcionais, principalmente na parede celular, nos componentes da membrana citoplasmática e no citoplasma. O acesso a estes alvos é determinado pela composição química e propriedades físico-químicas que cada biocida apresenta, bem como pelas interações com o material extracelular, pela composição química e morfologia das células (Denyer e Stewart, 1998). A escolha de um agente antimicrobiano com ampla atividade se faz necessária quando o alvo é constituído por distintos tipos de microrganismos. Por vezes, princípios ativos em associação apresentam sinergismo na erradicação de comunidades de microrganismos e/ou quando estes são resistentes a tratamentos convencionais.

De acordo com seu caráter químico, os biocidas podem ser classificados em dois grandes grupos (Burk, 1984): oxidantes (tais como ozônio, peróxido de hidrogênio, compostos de cloro) e não-oxidantes (compostos sulfurados, estanho, isotiazolinonas, sais de cobre, aldeídos, sais quaternários de amônio, dentre outros).

Embora apresentem diferenças químicas importantes, o modo primário de ação dos biocidas oxidantes consiste em oxidar compostos constituintes das células microbianas, sendo conseqüentemente efetivos contra quase todos os tipos de microrganismos. Até o momento, não há relato sobre desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos a este tipo de biocida. Porém, sua aplicação em sistemas de usinagem de metais apresenta alguns inconvenientes, pois são facilmente reativos (não liberam residual de agente ativo a longo prazo), podem ocasionar modificações nas características originais do fluido de corte e corrosão em equipamentos e tubulações. Portanto, a maioria dos agentes antimicrobianos atualmente utilizados pelo segmento industrial mencionado é pertencente ao grupo dos biocidas não-oxidantes. Na Tabela 1 estão listados alguns dos biocidas não-oxidantes comumente utilizados no segmento de usinagem de metais.

Tabela 1: Biocidas não-oxidantes freqüentemente usados no controle de contaminações em sistemas de fluido de corte (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda., 2006) e seu princípio de ação (Burk, 1984).

Grupo	Nome comercial de ativos	Componente celular-alvo
Compostos sulfurados	Tiocianometiltiobenzotiazol (TCMTB)	Membrana (reação com enzimas e grupos S-H)
Compostos de Isotiazolinona	Clorometilisotiazolinona Metilisotiazolinona	Parede; membrana; citoplasma (coagulação de proteínas)
Aldeídos	Triazina Dimetiluréia	Parede
Derivados halogenados	Bronopol Iodopropinilbutilcarbamato (IPBC)	Parede; membrana (enzimas e grupos S-H); citoplasma (grupos tiol e amino)

Os biocidas não-oxidantes, que englobam uma enorme variedade de compostos orgânicos, exercem atividade antimicrobiana atuando sobre os microrganismos por interferência em seu metabolismo e/ou pela desintegração da parede celular. Porém, contrariamente aos biocidas oxidantes, os microrganismos podem adaptar-se aos biocidas não-oxidantes, principalmente se estes forem aplicados em dosagens abaixo da concentração mínima requerida e por longos períodos. Portanto, sua aplicação tem requerido melhoria nos critérios de seleção dos compostos para o tratamento de contaminações.

A Tabela 2 mostra o perfil de eficácia de alguns destes biocidas contra bactérias planctônicas, não havendo, infelizmente, relação direta destes dados quando as mesmas se encontram em biofilmes.

O modo de aplicação do biocida é tão importante quanto sua seleção; a simples adição do produto pode não reduzir a contaminação microbiológica, sob pena de os problemas se agravarem.

Tabela 2: Efetividade microbiológica conhecida dos biocidas mais utilizados no segmento industrial de usinagem de metais (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda, 2006).

Bactéria	Biocida						
	Isotiazolinonas, semi-acetais e TCMTB	Isotiazolinonas e semi-acetais	Triazina	Piritionato de sódio	Isotiazolinonas, semi-acetais e derivados halogenados	Bronopol	Isotiazolinonas e Bronopol
<i>Bacillus</i> sp	X	X	X	X	X	X	X
<i>Cellulomonas</i> sp	X	X	X	X			
<i>Clostridium</i> sp							X
<i>Desulfovibrio</i> sp						X	X
<i>Enterobacter</i> sp	X	X		X	X		
<i>Escherichia coli</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>Flavobacterium</i> sp					X	X	X
<i>Klebsiella</i> sp					X	X	
<i>Proteus</i> sp					X	X	X
<i>Pseudomonas</i> sp	X	X	X	X	X	X	X
<i>Salmonella</i> sp	X	X	X	X		X	
<i>Staphylococcus</i> sp	X	X		X		X	
<i>Streptomyces</i> sp			X				

As estratégias de aplicação podem ser em choque ou de maneira contínua. As diferenças entre estas se dão na sua concentração e frequência de adição.

A opção pela primeira estratégia envolve a aplicação do biocida em altas concentrações e em intervalos de tempo regulares. É especialmente indicada em situações em que os biofilmes apresentam grande espessura, quando os circuitos de fluidos apresentam concentrações microbianas muito elevadas e quando as condições do sistema favorecem nova e rápida instalação dos microrganismos (Lutey, 1995).

A segunda estratégia traduz-se pela alimentação contínua de biocida a baixas, porém efetivas, concentrações durante o período de operação de um determinado sistema industrial, com o intuito de prevenir ou inibir a formação inicial de biofilme. A aplicação contínua de biocida é geralmente implementada quando se pretende estabelecer condições biostáticas no sistema (Wills e Bott, 1997).

Pujo e Bott (1992) relatam que um determinado biocida pode se mostrar pouco eficaz no tratamento de biofilmes já estabelecidos quando adicionado de forma contínua e a baixas concentrações. Contudo, as mesmas concentrações podem ser suficientes para prevenir o desenvolvimento de biofilmes quando aplicadas em fase precoce de seu desenvolvimento. Em um sistema industrial o processo de controle deve ser delineado no sentido de que haja adequação do projeto para a construção e instalação dos equipamentos (sem zonas de estagnação), utilização de materiais que apresentem características que

facilitem a limpeza e implementação de monitoramento para controle efetivo de contaminantes e de sua remoção (LeChevallier, 1990).

2.4- Fluidos de corte

Nas operações de usinagem, a utilização do fluido de corte é essencial para a obtenção de melhor acabamento superficial da peça, com o mínimo de desgaste de ferramentas e equipamentos. Embora o sistema água/óleo possua vasta aplicação, oferecendo a vantagem da refrigeração proporcionada pela água, e a de lubrificação, pelo óleo, ele é freqüentemente atacado por microrganismos, pois apresenta elementos nutritivos para estes, as cadeias de hidrocarboneto e água (Morton, 1987).

Conforme ilustrado na Figura 4, o circuito do fluido no processo de usinagem de metais é composto por várias etapas que envolvem a recirculação do mesmo por um longo período de utilização. Geralmente, tal categoria de planta industrial é composta por tanques de armazenamento do óleo onde há a mistura da emulsão (óleo mineral e água), por maquinários (tornos) expostos ao fluido durante o corte das peças, e por canaletas (abaixo do piso ou no teto) para a passagem do fluido de retorno.

Em grandes empresas, os processos são dinâmicos, o que contribui para a diminuição da incidência de formação do biofilme, pois a distribuição do biocida é mais efetiva. O auxílio de um eliminador de óleo sobrenadante pode ser acoplado em cada máquina para reduzir o foco de instalação de contaminantes microbiológicos. Em médias e pequenas empresas, os recursos de instalação encontrados diferem drasticamente dos observados em grandes centrais, tendo como principal característica a parada do processo durante dias (finais de semana), similarmente à situação apresentada por Allsopp e Seal (1986), fator este que é favorável à proliferação e instalação microbiana em pontos críticos do sistema. Diante disto, o período de utilização do fluido torna-se reduzido e a perda do produto é inevitável. Porém, o descarte é um processo indesejável, pois envolve alto custo e burocráticos procedimentos legais, uma vez que deve ser realizado por empresas especializadas.

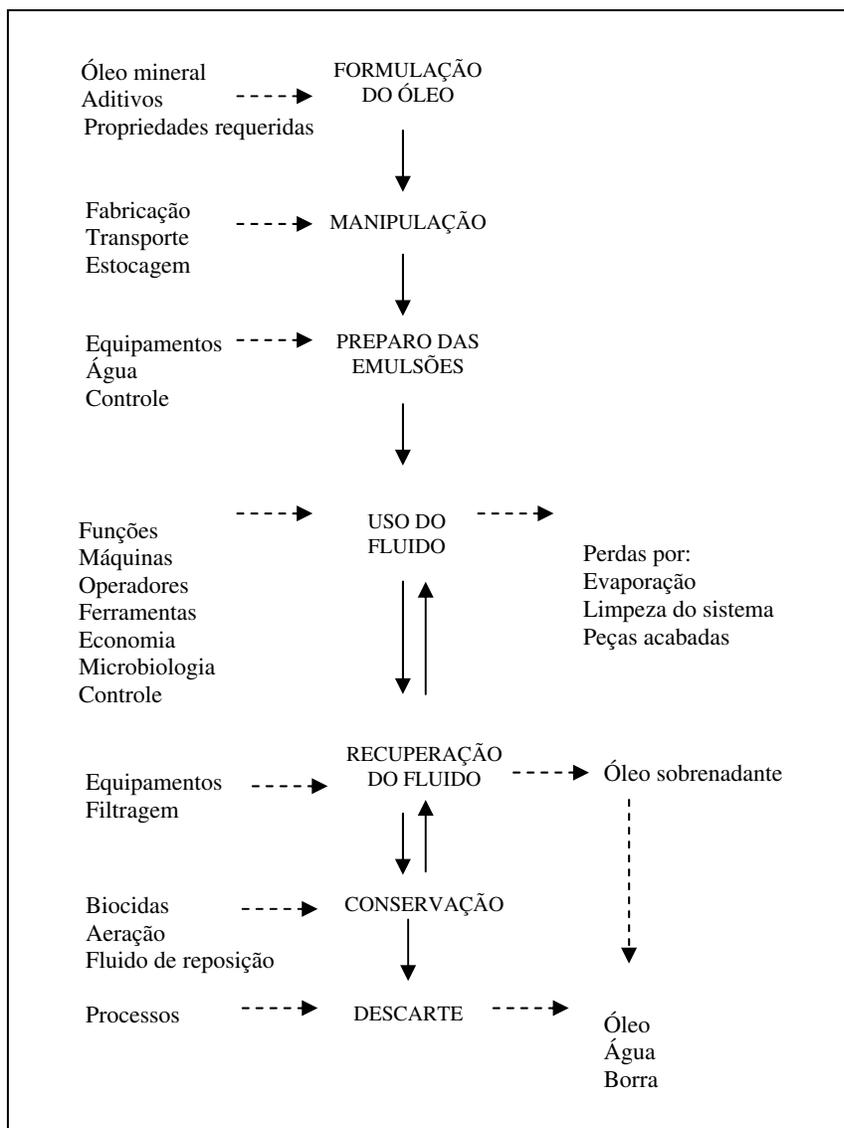


Figura 4: Circuito do fluido de corte na indústria (adaptada de Runge e Duarte, 1989).

Para descrever os efeitos que uma emulsão deteriorada pode ocasionar, um caso hipotético, com dados baseados na experiência industrial, foi apresentado por Allsopp e Seal (1986) e é descrito a seguir. Uma indústria fabricante de peças para automóveis utiliza emulsão mineral sem biocida em seu sistema. A emulsão perde água por evaporação durante o processo e é periodicamente recomposta com a adição de água provinda de um poço. Os problemas começam a surgir quando o pH apresenta-se abaixo do aceitável e as partículas de óleo (micelas) aumentam de diâmetro. A vida útil dos equipamentos é reduzida e os operadores queixam-se de lesões em suas mãos. Aos finais de semana, as bombas que promovem a recirculação da emulsão são desligadas e o fluido é conduzido ao

tanque central. No retorno às atividades operacionais, houve a desestabilização da emulsão, que foi distribuída ao sistema, seguida por um forte odor de sulfeto de hidrogênio. As peças fabricadas começaram a apresentar corrosão durante a estocagem e os filtros ficaram prematuramente bloqueados. Dentre as prováveis causas destes problemas, estão a falta de tratamento com biocida na emulsão, a adição de água inadequada no sistema e a falta de limpeza em equipamentos. O resultado é o desenvolvimento de uma ampla e diversa colonização microbiana. Acima de 30 espécies podem ser isoladas de uma única emulsão contaminada, podendo conter desde simples oportunistas até patógenos humanos. Bactérias comumente encontradas em fluidos de corte são citadas como sendo do tipo Gram-negativas, tais como *Escherichia coli*, *Proteus* sp, *Salmonella* sp, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes* sp., e Gram-positivas, como *Brevibacterium* sp, *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. (Rohm & Haas Company, 2005).

Em estudos realizados por Veillette *et al.* (2004), a progressão da contaminação microbiana em uma indústria foi avaliada durante 6 meses após a limpeza rotineira de equipamentos e recarga com novo fluido semi-sintético, cujo sistema foi controlado com biocidas. O fluido antecedente à troca apresentou concentração total em microrganismos de $5,7 \times 10^7$ cel/mL e amostras coletadas durante o uso do novo fluido por 12 horas, um, três e seis meses indicaram contagens de $6,9 \times 10^6$ cel/mL, $2,2 \times 10^6$ cel/mL, $3,6 \times 10^8$ e de $6,1 \times 10^8$ cel/mL, respectivamente. Estes resultados demonstraram que métodos de limpeza inadequados não eliminam totalmente os microrganismos que porventura estejam aderidos em tanques e tubulações, e que rapidamente podem recontaminar o sistema, apesar da adição convencional de biocidas.

A FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente), no estado do Rio de Janeiro, estabelece, dentre tantos outros critérios, o teor máximo de 20 mg/L de óleos minerais para a eliminação de efluentes líquidos (Runge e Duarte, 1989). Em função de somente esta restrição, o descarte de emulsões contendo óleo mineral a 5% torna-se dificultado, fazendo-se necessário reduzir a concentração do produto em grandes volumes de diluente.

Em adição, a poluição gerada pelo descarte de uma tonelada de fluido usado, no solo ou em cursos d'água, equivale, por dia, ao esgoto doméstico de 40 mil habitantes. A queima indiscriminada do óleo lubrificante usado, sem tratamento prévio de

desmetalização, gera emissões significativas de óxidos metálicos, além de outros gases tóxicos (Runge e Duarte, 1989).

O uso de biocidas é, portanto, um recurso importante no controle da proliferação de microrganismos no fluido circulante, com o propósito de evitar ou retardar o processo de descarte do mesmo.

2.5- Recuperação microbiana efetiva em amostras industriais contaminadas

Uma etapa de grande relevância para os ensaios laboratoriais em que são estudadas células sésseis e planctônicas é a recuperação efetiva dos microrganismos em amostras contaminadas, visto que esta é a etapa inicial de praticamente todos os estudos realizados na área. As metodologias para estes ensaios estão descritas em diferentes normas, compêndios e diretivas, com os protocolos definidos para cada segmento industrial, que, por sua vez, podem requerer diferentes diluentes e técnicas.

Embora se verifique um certo consenso nos diluentes sugeridos por vários autores, não é apontado um diluente específico, tido como universal, para a diluição e recuperação de contaminantes provenientes de diferentes tipos de amostra, conforme discutido a seguir.

A Farmacopéia Brasileira (1988), por exemplo, indica, para amostras solúveis em água, o diluente tampão fosfato de sódio e, para substâncias oleosas, água peptonada com Tween 80 (polisorbato). Já o Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos (Silva *et al.*, 2001a, 2001b, 2001c) indica, para análises tanto de sólidos quanto de líquidos, a solução salina, a água peptonada ou o tampão fosfato de sódio, enquanto o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Messer *et al.*, 1992) sugere os mesmos diluentes, além daqueles específicos para amostras particulares.

A discussão a respeito da escolha do diluente na preparação de amostras para contagem de células viáveis (planctônicas e em biofilmes) não é recente. Straka e Stokes, em 1957, observaram que um diluente inadequado pode causar rápida morte celular e afetar o resultado final obtido.

Diversos estudos, como os de Hall (1970) e Oblinger e Kennedy (1976), indicam a água peptonada como o diluente de melhor recuperação celular. Mian *et al.* (1997) mostraram que para leveduras em cultura pura e mista, dentre os vários diluentes testados, a água

peptonada causa a menor taxa de morte duas horas após a diluição inicial; porém, por conter nutrientes essenciais para os microrganismos, a melhor recuperação resultante do uso da água peptonada pode estar fortemente relacionada com a multiplicação celular ocorrida entre a etapa de diluição e a de plaqueamento, uma vez que o tempo de duplicação celular pode ser de aproximadamente 20 minutos para algumas espécies de leveduras e para um número significativo de bactérias.

As indústrias químicas, mais especificamente os fabricantes de biocidas que fazem análises microbiológicas de rotina, se deparam com um dilema no qual as amostras sob análise são provenientes de distintos segmentos (tintas e revestimentos, aditivos para concreto, detergentes, resinas e adesivos, fluidos de corte, dentre outros) e que devem ser processadas simultaneamente, tornando-se pouco viável utilizar, em paralelo, vários diluentes recomendados pela literatura especializada.

É, portanto, relevante a seleção de um diluente, ou conjunto restrito de diluentes, apropriado para a recuperação em laboratório dos contaminantes provenientes de indústrias variadas.

2.6- Sistemas de ensaio para a formação e erradicação de biofilmes

Há diversos sistemas de ensaio disponíveis para o estudo de biofilmes, tais como quimiostatos, dispositivo de Robbins, dentre outros (Ceri *et al.*, 2001). Tais dispositivos são, em sua maioria, de difícil manuseio, passíveis de contaminação e conduzem à obtenção de resultados tardios, além de requerer amplo espaço físico para instalação.

O cultivo celular em quimiostatos promove a formação do biofilme nas paredes de um reator operado em contínuo, pela ação de tensões cisalhantes devido à agitação circular do inóculo. Este método gera grande produção de material, ideal para o estudo da fisiologia do biofilme, porém sua remoção das paredes do equipamento é difícil e inviabiliza que sejam realizados ensaios posteriores quando é imprescindível a manutenção intacta da estrutura do biofilme, como em testes de susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

O dispositivo de Robbins consiste em vários corpos de prova individuais (podendo ser constituídos de materiais diversos), conectados a um suporte com canais por onde ocorre o fluxo de meio de cultura contendo os microrganismos-teste, através de tubulações

de borracha e bombas peristálticas. Os ensaios de susceptibilidade realizados com o material obtido nos cupons são eficientes, porém a utilização deste dispositivo tem como desvantagem a dificuldade de eliminação do material formado nas tubulações, dificultando sua limpeza.

Não obstante, estes dispositivos foram amplamente utilizados e contribuíram fortemente para o desenvolvimento e aperfeiçoamento da técnica de produção artificial de biofilmes (Ceri *et al.*, 2001).

O uso de cilindros carreadores de biofilme (corpos de prova na forma de cilindros metálicos ocos), utilizados para a verificação da eficácia de desinfetantes, podem ser considerados como uma das técnicas pioneiras de miniaturização do método de formação de biofilmes, sem requerer tubulações para o fluxo de inóculo. Porém, o ensaio ainda é de trabalhoso manuseio e demorado por requer muitos passos para sua finalização.

Com o advento do uso de microplacas com poços para esta finalidade, a introdução do estudo de biofilmes em laboratórios de pequeno porte foi facilitada (O'Toole e Kolter, 1998). As microplacas têm como vantagem o baixo custo e a possibilidade de serem utilizadas como sistema de triagem para detecção de mutantes alterados quanto às propriedades de adesão. Porém, seu uso não permite análise microscópica (as células sésseis aderem à superfície dos poços), os resultados não são reprodutíveis em outros sistemas e a quantificação das células é grosseira (coloração dos poços com cristal violeta e posterior quantificação do corante extraído com etanol para a estimativa da biomassa formada).

O dispositivo MBEC™ foi projetado pelo grupo de microbiologia da Universidade de Calgary, Canadá, para uso complementar em microplaca com poços (Ceri *et al.*, 2001). Este dispositivo produz múltiplos e equivalentes biofilmes nos corpos de prova, e os ensaios podem ser automatizados. O aparato consiste em uma tampa onde se encontram acoplados 96 pinos de mesmo tamanho, para a formação dos biofilmes, e de uma base com canais para adição da amostra-matriz que contém os microrganismos. A formação do biofilme é proporcionada quando o dispositivo, em contato com a amostra contaminada, é colocado em uma mesa agitadora para que se inicie o processo de indução da adesão celular por cisalhamento. Posteriormente, a tampa com o material celular aderido nos pinos é acoplada em outra placa com múltiplos poços para o teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos que se deseja avaliar. Caso haja necessidade de averiguação da formação do biofilme em diferentes etapas do ensaio, a tampa do aparato permite a remoção de pinos

individualmente, sem que haja o comprometimento da estrutura do material aderido (MBEC Bioproducts Incorporation, 2005).

As principais diferenças entre os sistemas de ensaio acima citados são sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3: Comparação entre sistemas de ensaio para o desenvolvimento de biofilmes (adaptada de Marques *et al.*, 2004).

Sistemas	Monitoramento em tempo real	Ensaio múltiplos e equivalentes	Facilidade de manuseio
Quimiostatos	Não	Não	Baixa
Dispositivo de Robbins	Não	Sim	Regular
Cilindros carreadores	Não	Sim	Regular
Microplacas com poços	Não	Sim	Média
Sistema MBEC™	Não	Sim	Alta

Vários estudos foram realizados utilizando o dispositivo MBEC™ para a formação de biofilmes em laboratórios clínicos, com a finalidade de atender às necessidades das áreas médica, veterinária e odontológica. Olson *et al.* (2002) aplicaram o método para a seleção de antibióticos contra patógenos veterinários isolados dos grupos Gram-positivos e Gram-negativos. Cada cepa foi inoculada em suspensão contendo 10^8 UFC/mL no dispositivo. A colonização de 10^6 UFC/pino ocorreu entre 4 a 24 horas (dependendo da taxa específica de crescimento do microrganismo). Ceri *et al.* (1999) estudaram cepas-padrão de isolados clínicos responsáveis por focos de infecções hospitalares e verificaram que o teste de susceptibilidade realizado com o dispositivo MBEC™ resulta em valores semelhantes aos determinados pelos protocolos do NCCLS (*National Committee on Clinical Laboratory Standards*, dos Estados Unidos), um instituto de padronização de normas para clínicas e laboratórios, o que indica ser este dispositivo também promissor para o estudo de biofilmes e de sua susceptibilidade a biocidas relacionados à área industrial.

Em um estudo com enfoque em biocidas, o dispositivo MBEC™ foi utilizado por Bardouniotis *et al.* (2001) para a formação de biofilme com a bactéria *Mycobacterium phlei* (importante nas áreas médica e industrial), para testar sua susceptibilidade a sete diferentes

produtos em dois períodos de contato. De acordo com os resultados obtidos, indicados na Tabela 4, os valores de MBEC foram superiores aos de MMC para todos os biocidas testados, exceto para o fenol com fenato de sódio em 30 minutos e para o monopersulfato de potássio em duas horas de contato. A dependência do tempo para o aumento da susceptibilidade foi efetivamente verificada em todos os casos, com exceção do valor de MBEC para o fenol com fenato de sódio. Em geral, as bactérias planctônicas foram mais susceptíveis aos biocidas que as células em biofilme.

Tabela 4: Comparação entre MMC e MBEC para vários biocidas e diferentes tempos de contato com biofilme de *Mycobacterium phlei* formado no dispositivo MBEC™ (adaptada de Bardouniotis *et al.*, 2001).

Biocida	Tempo de contato e erradicação celular (mg/L)			
	30 minutos		2 horas	
	MMC	MBEC	MMC	MBEC
Hipoclorito de sódio 5,25%	0,06 ± 0	0,12 ± 0	0,03 ± 0	0,06 ± 0
Nitrato de prata	0,03 ± 6	0,31 ± 0	< 0,01 ± 0	0,23 ± 78
Acetato de clorexidina 2%	0,02 ± 0	0,08 ± 0	0,01 ± 0	0,04 ± 0
Peróxido de hidrogênio 30%	2,00 ± 0	> 2,50 ± 0	0,75 ± 250	1,25 ± 0
Glutaraldeído 70%	0,16 ± 0	1,25 ± 0	0,08 ± 0	0,31 ± 0
Fenol 1,56% com Fenato de sódio 0,06%	7,80 ± 0	7,80 ± 0	0,39 ± 0	7,80 ± 0
Monopersulfato de potássio 21,4%	8,30 ± 1515	40,00 ± 0	1,25 ± 0	1,25 ± 0

Apesar dos dispositivos para o estudo de biofilmes mais recentes terem sido aperfeiçoados em relação aos métodos pioneiros, atualmente, não há um aparato que atenda a todos os requisitos desejáveis para a obtenção de biofilmes *in vitro*, porém novos sistemas e técnicas para o seu estudo estão em desenvolvimento para aplicação futura.

2.7- Tendências no estudo de biofilmes

Várias técnicas estão sendo estudadas para o controle de biofilmes; dentre elas são citadas as que utilizam enzimas a fim de degradar a matriz extracelular envolvida na adesão dos colonizadores e na integridade estrutural do biofilme. Deste modo, este pode ser mais facilmente removido e os microrganismos, então, ficariam mais expostos à ação dos biocidas (Johnsrud, 1997). Porém, a heterogeneidade e complexidade dos componentes que fazem parte da matriz do biofilme e a falta de enzimas específicas que possam ser aplicadas são as principais barreiras para que este método se imponha e seja considerado uma real alternativa com custos aceitáveis.

O uso de bacteriófagos, também sob estudo atualmente, além da ação lítica proporcionada, tem a capacidade de induzir a síntese de enzimas capazes de degradar polímeros (Hughes *et al.*, 1998). Porém, o desenvolvimento de resistência dos microrganismos ao ataque por fagos, a grande variedade de espécies que pode estar nos biofilmes e, ainda, o precário entendimento do ecossistema bactéria-fago são os principais pontos a serem considerados para sua aplicação.

Assim, até que as técnicas anteriormente descritas sejam melhor estabelecidas, atualmente, o uso de biocidas para a prevenção, controle e erradicação de biofilmes indesejados é visto como uma estratégia efetiva, desde que tais biofilmes possam ser adequadamente reproduzidos *in vitro*, permitindo a seleção do tipo, da dosagem e do regime de aplicação do agente antimicrobiano apropriado.

3- METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 – Material

3.1.1- Amostras

Para o ajuste das condições analíticas para enumeração e isolamento de microrganismos, foram selecionados cinco distintos segmentos industriais, cujas amostras foram agrupadas de acordo com as especificações em relação ao nível microbiológico aceitável para a aprovação e comercialização das mesmas. Foram testadas 13 amostras no total, incluindo duas amostras de aditivo para concreto (segmento 1), seis amostras de pasta de carbonato de cálcio (segmento 2), duas amostras de cola branca escolar e uma amostra de tinta guache (segmento 3), duas amostras de detergente doméstico (segmento 4) e cinco amostras de fluido de corte mineral (segmento 5).

Para a caracterização dos grupos microbianos mais freqüentes em fluidos de corte, foram analisadas 163 amostras provenientes de diferentes indústrias.

Para o teste de formação e susceptibilidade do biofilme, foi utilizada uma amostra representativa de fluido de corte do tipo mineral, em operação industrial contínua por dois anos, coletada em uma indústria de usinagem de metais, no estado de São Paulo, apresentando um histórico de freqüentes problemas no controle microbiano, sendo designada como inóculo 1. O mesmo é constituído por base parafínica e por hidrocarbonetos (cadeias lineares ou ramificadas contendo entre 20 a 25 átomos de carbono). O inóculo 2 foi obtido pela suspensão dos microrganismos isolados da amostra contaminada, em fluido de corte estéril do mesmo tipo.

3.1.2- Microrganismos

Os microrganismos-teste utilizados foram provenientes da amostra contaminada, utilizados de duas maneiras: em consórcio no fluido de origem, e em suspensão mista com as cepas isoladas inoculadas no fluido estéril.

3.1.3- Soluções

Para a diluição das amostras industriais avaliadas (segmentos 1 a 5) foram utilizadas água destilada, solução aquosa de Tween-80 (U.S.P.) a 0,5% (v/v), caldo Letheen (caldo nutriente contendo lecitina de soja e Tween-80, Difco), solução salina (Synth) a 0,85% (m/v) e água peptonada (peptona Difco) a 0,1% (m/v).

Para a lavagem do biofilme foi usada solução salina (NaCl Synth, a 0,85% m/v). Todas as soluções acima citadas foram esterilizadas antes do uso.

Corantes de Gram (Newprov) foram utilizados para a caracterização dos contaminantes estudados.

3.1.4- Meios de cultura

Para a detecção de microrganismos por grupos foram utilizados para bactérias aeróbias totais e bactérias esporuladas o meio Tryptic Soy Agar, TSA (Difco), para bactérias coliformes o meio Eosin Methylene Blue Agar, EMB (Difco), para bactérias anaeróbias o meio Fluid Thioglycollate Medium, FTM (Difco), para bactérias sulfato-redutoras o meio Postgate Medium B (formulado) e para fungos e leveduras o meio Sabouraud Dextrose Agar, SDA (Difco).

No enriquecimento e multiplicação celular de bactérias (manutenção das culturas e preparo para testes) foi usado o Tryptic Soy Broth, TSB (Difco) como meio líquido em tubos de ensaio.

Para a investigação de bactérias degradadoras de hidrocarboneto, foi utilizado o Minimal Medium Davis (Difco), suplementado com 5% do óleo de corte mineral estéril (MMO, formulado).

Os meios de cultura, cujas formulações estão explicitadas nos Anexos A.2.1 a A.2.7, foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, esterilizados a 121°C por 20 minutos e resfriados a 40°C, antes do uso.

3.1.5- Biocidas

Foram testados sete biocidas compatíveis com sistemas óleo/água (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda, 2006), contendo um ou mais princípios ativos, conforme indicado na Tabela 5, para a erradicação do biofilme. As fórmulas estruturais dos princípios ativos estão apresentadas no Anexo A.1.

Tabela 5: Descrição dos biocidas utilizados (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda, 2006).

Biocida	Grupo de Ativos	Nome químico dos ingredientes ativos	Número CAS*
FBP-124	Composto sulfurado	2-tiocianometiltiobenzotiazol	21564-17-0
	Aldeído	Dimetiluréia	140-954
	Compostos de Isotiazolinona	2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona	26530-20-1
		5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona	26172-55-4
		2-metil-4-isotiazolin-3-ona	2682-20-4
FBP-128	Aldeído	Dimetiluréia	140-954
	Compostos de Isotiazolinona	2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona	26530-20-1
		1,2-benzisotiazolin-3-ona	2634-33-5
FBP-140	Piritionatos	Sódio-2-piridinatiol-n-óxido	3811-73-2
FBP-417	Composto de	2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona	26530-20-1
	Isotiazolinona Aldeído	Dimetiluréia	140-954
	Derivado halogenado	3-iodo-2-propinil butil carbamato	55406-53-6
BNP-115	Derivado halogenado	2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol	52-51-7
BP-180	Aldeído	Hexahidro-1,3,5-tris(2-hidroxietil)s-triazina	4719-04-4
BP-509	Derivado halogenado	2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol	52-51-7
	Compostos de Isotiazolinona	5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona	26172-55-4
		2-metil-4-isotiazolin-3-ona	2682-20-4

* CAS (*Chemical Abstracts Service*), 2006.

Os biocidas foram testados em suas dosagens convencionais de uso e entre dez e cem vezes acima desta, para a verificação da eficácia na erradicação das células sésseis. Os mesmos também foram aplicados às células planctônicas.

As dosagens preconizadas para uso industrial dos biocidas testados são de: 0,15% (v/v) FBP-124; 0,10% (v/v) FBP-128; 0,15% (v/v) FBP-140; 0,50% (v/v) FBP-417; 0,30% (v/v) BNP-115; 0,12% (v/v) BP-180 e de 0,20% (v/v) BP-509.

3.1.6- Aparatos

Para o desenvolvimento e teste de susceptibilidade do biofilme aos biocidas foram utilizados o dispositivo de acrílico MBEC™ (modelo HTP, High-Throughput Screening, Figura 2) e placa com 96 poços do tipo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), respectivamente. Quando necessário, os pinos da tampa do dispositivo foram retirados individualmente com o auxílio de uma pinça de aço inoxidável (Ervin Guth modelo Crile, 16 cm, ponta curva).

Para o preparo de lâminas para exame microscópico com coloração de Gram (caracterização das células) foi utilizado Bico de Bunsen e lâminas de vidro (Perfecta).

3.1.7- Equipamentos

Para a padronização do inóculo, foi usado um turbidímetro (Densimat, bioMérieux) calibrado com a escala padrão de McFarland, descrita no Anexo A.3.

Um microscópio óptico binocular (modelo BH2, Olympus) foi usado para o exame morfológico e caracterização dos microrganismos.

Para o crescimento das culturas microbianas foi usada uma estufa incubadora (modelo BOD, Tecnal). Uma plataforma inclinável (tipo gangorra) com ângulo de 5° e 10 oscilações por minuto (construída para esta finalidade) acomodou o dispositivo MBEC™ para gerar o biofilme.

Um equipamento sonicador (Ultrasonic Cleaner, Thornton USC-1450, 25 kHz) foi utilizado para a liberação do biofilme dos corpos de prova (pinos) para contagem das células aderidas (contador de colônias CP 602 Phoenix). Para homogeneização de amostras foi utilizado um agitador mecânico (Vortex). O pH da amostra foi mensurado com um medidor de pH (modelo DM-20, Digimed) e a viscosidade, com um viscosímetro (modelo DV-I, Brookfield).

3.2 – Métodos

Todas as manipulações assépticas foram feitas em sala estéril com pressão de ar positiva, equipada com câmara de fluxo laminar vertical (Veco, VLFS-12, com lâmpada UV), nas dependências laboratoriais da empresa IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda.

3.2.1- Avaliação de diluentes para a recuperação de microrganismos em amostras contaminadas

Amostras provenientes de cinco segmentos industriais (item 4.1.1) foram diluídas em série e plaqueadas em triplicata (Maturin e Peeler, 2001), utilizando os cinco tipos de diluentes e os meios de cultura para a detecção de microrganismos por grupos descritos nos itens 4.1.3 e 4.1.4, respectivamente.

Na diluição em série, uma alíquota de 1 mL da amostra foi transferida para um tubo contendo 9 mL do diluente esterilizado (diluição 10^{-1}). A amostra contida neste tubo foi homogeneizada e uma alíquota de 1 mL transferida a outro tubo idêntico ao primeiro, e assim sucessivamente até a obtenção da diluição de 10^{-8} .

Para o plaqueamento, 1 mL de amostra de cada tubo, nas diferentes diluições preparadas, foi adicionado em placas de Petri juntamente com 20 mL do meio de cultura seletivo para cada grupo microbiano, conforme descrição no item 3.1.3. As placas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para as bactérias e a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ por até 7 dias para detecção de fungos filamentosos e leveduras. Posteriormente à incubação, na contagem das colônias microbianas foi considerado o fator de diluição da amostra plaqueada.

O diluente selecionado, por melhor recuperar as células contidas na amostra, foi utilizado nos demais ensaios em que se empregou o procedimento de diluição em série.

3.2.2- Identificação de grupos microbianos em fluidos de corte de diversas origens

Conforme mencionado anteriormente, o tipo de produto selecionado para a investigação microbiana, formação e erradicação do biofilme foi fluido de corte. Levando-se em consideração o aspecto de que cada tipo de óleo componente dos diversos fluidos

disponíveis é propício ao desenvolvimento de microrganismos específicos (Runge e Duarte, 1989), amostras de fluido de corte mineral provenientes de várias indústrias foram analisadas. A avaliação do perfil microbiológico foi realizada por diluição em série e plaqueamento das amostras, conforme item 3.2.1, salvo para a análise de bactérias sulfato redutoras, que podem requerer até 30 dias de incubação.

3.2.3- Caracterização físico-química e microbiológica do fluido de corte em estudo

O fluido de corte em avaliação, cuja procedência é explicitada no item 3.1.1, foi cedido pela indústria usuária para os estudos aqui propostos.

As características físico-químicas dos fluidos de corte contaminado e sem contaminação, foram analisadas quanto a pH, viscosidade e densidade.

O pH e a viscosidade foram mensurados empregando os equipamentos adequados para cada ensaio, conforme descrito no item 3.1.8. A densidade foi calculada pela relação entre a massa e o volume da amostra.

O grau de contaminação foi avaliado por perfil microbiológico (com diluição em série e plaqueamento, item 3.2.1).

3.2.4- Isolamento e caracterização dos contaminantes planctônicos aeróbios do fluido de corte

Considerando que as bactérias aeróbias são pioneiras na formação de biofilmes (Christensen e Characklis, 1990) e que a caracterização de microrganismos anaeróbios é dificultosa, foram analisadas somente as cepas microbianas pertencentes ao grupo das bactérias aeróbias presentes no fluido de corte estudado.

A amostra de fluido de corte contaminada foi diluída e plaqueada em meio de cultura sólido, TSA. Posteriormente à incubação em estufa durante 48 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, uma placa com aproximadamente 30 unidades formadoras de colônia foi selecionada para o isolamento das cepas. Estrias de esgotamento consecutivas foram realizadas (com o auxílio de alça de inoculação), até a obtenção de culturas puras. As culturas puras obtidas foram semeadas em tubos inclinados com TSA, cultivados por 48 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, e depois foram

conservadas sob refrigeração a 5°C, como culturas-mãe. Os repiques necessários para cada um dos experimentos foram preparados a partir destas culturas.

A caracterização dos isolados consistiu em exame microscópico das células coradas (coloração de Gram) para a classificação da morfologia e tipo de membrana celular. A prova para detecção de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos foi realizada seguindo a metodologia proposta por Morton (1987).

O procedimento de coloração de Gram iniciou-se com a fixação do microrganismo isolado em lâmina de vidro com o calor fornecido pela chama de um bico de Bunsen. O primeiro corante adicionado à lâmina foi o cristal violeta, que é absorvido pelas células. Após um minuto de contato, o excesso de corante foi retirado e o reagente lugol foi adicionado, também durante um minuto. O lugol forma um complexo com o cristal violeta, o qual é fortemente retido pelas bactérias e que não é facilmente removido pelo tratamento posterior com álcool-acetona. As bactérias descoradas pela solução de álcool-acetona, durante 30 segundos, foram coradas pelo segundo corante, fucsina, mantido na superfície da lâmina durante 30 segundos. Após a coloração, a visualização das células foi feita em microscópio óptico, com o uso da objetiva para aumento da imagem em 1.000 vezes. As células coradas pelo cristal-violeta (roxas) foram classificadas como Gram-positivas, e as coradas pela fucsina (vermelhas) como Gram-negativas.

O teste de degradação de hidrocarboneto se baseia no cultivo dos microrganismos em meio de cultura contendo óleo de corte mineral como única fonte de carbono. Cada cepa isolada do fluido de corte contaminado foi estriada no centro da placa de Petri contendo de 20 a 25 mL do meio MMO solidificado (Anexo A.2.7). As placas foram incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por até 14 dias. O microrganismo foi considerado como degradador quando foi detectada a formação de um halo ao redor da cultura microbiana, ocasionado pelo desarranjo das moléculas da emulsão e indicando o consumo do carbono fornecido pelo óleo.

3.2.5- Teste de susceptibilidade para determinação da MIC e da MMC

Para a determinação da concentração mínima de biocida requerida para inibir o crescimento das células planctônicas, foram distribuídos, em tubos de ensaio, 3 mL de meio de cultura líquido TSB inoculado com 1% da amostra contaminada, preparados para sete

diluições de cada biocida testado (item 3.1.5), em triplicata. Os tubos-controle contiveram: meio de cultura sem o inóculo (controle negativo), meio de cultura com o inóculo (controle positivo) e meio de cultura com o biocida (controle da turbidez inicial).

A diluição do biocida foi feita em meio de cultura TSB, partindo do triplo de sua concentração de uso. Adicionou-se 3 mL do biocida no primeiro tubo preparado, homogeneizando-o adequadamente para então retirar 3 mL deste e adicionar ao tubo posterior (diluição 1:1). Tal procedimento foi repetido, sucessivamente, até o último tubo, que conteve a menor concentração do biocida. Após incubação por 24 horas, a leitura dos resultados foi feita pela observação da alteração da turbidez inicial, causada pelo crescimento microbiano. A concentração mínima inibitória (MIC) de cada biocida foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de microrganismos (tubo sem turvação). O meio contido nos tubos com resultado negativo (sem crescimento) foram estriados em meio de cultura sólido (TSA) para a determinação da concentração mínima de morte dos microrganismos-teste. A MMC do biocida foi definida como a menor concentração do biocida capaz de apresentar ausência de crescimento microbiano nas placas estriadas a partir dos tubos com crescimento negativo.

3.2.6- Avaliação da eficácia de preservação com diferentes biocidas na emulsão contaminada

O ensaio denominado teste de eficácia de conservantes, ou teste de desafio, tem como princípio a avaliação da eficácia de preservação de um dado produto, através de sua contaminação proposital com elevada carga microbiana. O procedimento adotado foi baseado no método descrito por Carturan (1999).

Inicialmente, o fluido de corte contaminado (10^9 UFC/mL) foi fracionado em sete frascos estéreis para serem testados com cada um dos biocidas, em suas respectivas concentrações de uso (item 3.1.5). Após 24 horas, as amostras foram inoculadas com o próprio fluido de corte contaminado, recebendo uma carga microbiana proporcional a aproximadamente 1% (500 μ L de inóculo para 50 g de amostra). As amostras foram incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas, diluídas em série e plaqueadas em meio de cultivo sólido (TSA) para a enumeração das células sobreviventes após 2 dias da primeira contaminação. O mesmo procedimento foi realizado, com reinoculações sucessivas na mesma amostra a

cada dois dias. As amostras aditivadas foram submetidas a 5 inoculações, sendo a última com o dobro da carga microbiana (2%). O teste foi finalizado quando uma das amostras apresentou nível de contaminação superior à industrialmente aceita (acima de 10^4 UFC/mL).

3.2.7- Desenvolvimento de biofilmes no dispositivo MBEC™

3.2.7.1- Preparo do inóculo

Dois diferentes tipos de inóculo foram empregados. A amostra original de fluido de corte mineral contaminado ($2,9 \times 10^9$ UFC/mL) serviu como um dos inóculos para a formação de biofilme (inóculo 1). Neste caso, os microrganismos continuaram em interação no meio ao qual estavam adaptados. Alternativamente, as cepas isoladas da amostra foram utilizadas para o mesmo fim, consistindo no segundo inóculo sob investigação (inóculo 2), com o intuito de averiguar se a técnica tradicional se aplicaria à indução das células já adaptadas, para a formação de biofilmes. Estas foram plaqueadas em meios de cultura específicos de acordo com os grupos microbianos presentes na amostra original. Foi realizada a seleção de aproximadamente dez colônias por grupo, que foram repicadas duas vezes consecutivas (24 e 48 horas) para a obtenção de células na mesma fase de crescimento. Para cada grupo microbiano preparou-se uma suspensão celular densa com $1,0 \times 10^{11}$ UFC/mL, utilizada para o preparo do inóculo misto, pela junção de partes iguais de cada suspensão. Esta mistura foi inoculada a 1% em fluido livre de contaminação para que a concentração de 10^9 UFC/mL fosse atingida, obtendo-se um nível de contaminação similar ao presente no inóculo 1.

Para a realização de testes posteriores ou para a eventual necessidade de repetição dos ensaios, a amostra contaminada foi armazenada sob refrigeração, em frasco esterilizado. Sua estabilidade à refrigeração foi periodicamente averiguada, medindo-se os parâmetros físico-químicos (pH, viscosidade, densidade) e microbiológico (viabilidade celular), os quais não foram significativamente alterados.

3.2.7.2- Formação do biofilme

Cada um dos inóculos (1 e 2) foi adicionado aos respectivos dispositivos MBEC™ (na sua base de canais interligados) em alíquota de 22 mL, sendo acrescidos 2 mL de meio nutritivo líquido (TSB). As placas foram transferidas para a plataforma inclinável, que proporcionou o cisalhamento necessário para a geração do biofilme, à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ ou $35\pm 2^\circ\text{C}$, em triplicata.

O tempo de incubação deve ser suficiente para proporcionar a obtenção de um biofilme final com cerca de 10^6 UFC/pino de células aderidas, de forma que em um pino controle, retirado com o alicate de ponta curva nos períodos de 3, 24, 27, 48 e 52 horas foi verificada a concentração celular.

O pino controle foi lavado em solução salina e sonicado em tubo de ensaio com meio de cultura líquido. O meio contido em cada tubo foi submetido à diluição em série, plaqueado em TSA e incubado por 48 horas para proceder à contagem das células aderidas para ambos os casos. O período de sonicação foi fixado em 30 minutos para este experimento, para comparação entre os resultados obtidos com os inóculos 1 e 2.

Para a averiguação da equivalência dos biofilmes formados no dispositivo MBEC™ foram destacados cinco pinos aleatoriamente, e avaliados em relação à quantidade de células aderidas, dispostos nas posições extremas (A1 e A12), central (D6) e medianas (F3 e F10) de duas placas, nos tempos de 24 e 48 horas a partir da incubação de uma amostra de fluido de corte mineral com $2,9 \times 10^9$ UFC/mL. Após o desprendimento do biofilme nos pinos, por sonicação durante 30 minutos, foi feita a diluição em série e o plaqueamento do caldo sonicado em meio de cultura TSA. As placas foram incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas para a posterior contagem das células aderidas.

3.2.7.3- Avaliação da influência dos tempos de formação e de sonicação do biofilme

Os inóculos foram submetidos ao processo de formação de biofilmes no dispositivo MBEC™, durante 3 dias, com amostragem em 24, 27, 44, 48 e 52 horas, sendo utilizados diferentes tempos de sonicação para a liberação das células aderidas (5 a 30 minutos).

Os tempos de coleta para o monitoramento da formação do biofilme de cultura mista foram estabelecidos levando em consideração o período normalmente requerido para um único microrganismo atingir 10^6 UFC/pino, considerado inferior a 24 horas (Olson *et al.*, 2002). Os tempos selecionados abrangem o dobro deste período e detalha as fases imediatamente anterior e posterior a 48 horas, a fim de verificar a manutenção ou não do comportamento observado no final das amostragens.

O período de sonicação baseou-se na metodologia do dispositivo MBEC™, necessário para averiguar a interferência da potência do equipamento utilizado na viabilidade celular.

Tais procedimentos possibilitaram determinar as variáveis período de incubação e de sonicação para este estudo, avaliando se haveria diferença significativa na obtenção de células aderidas com a variação dos mesmos.

3.2.8- Teste de susceptibilidade para determinação da MBEC

Após a formação do biofilme em condições otimizadas, foi realizada a lavagem dos pinos contidos na tampa do dispositivo, em placa com poços contendo 0,2 mL de solução salina por poço, para a remoção de bactérias planctônicas fracamente aderidas.

Considerando a capacidade de ensaio para cada dispositivo MBEC™, foi possível testar sete biocidas a quatro concentrações, em triplicata, além dos pinos controle necessários para a enumeração das células aderidas após a formação do biofilme. Os biocidas foram testados inicialmente em concentrações 10, 25, 50 e 75 vezes superiores às respectivas concentrações de uso, pois de acordo com Lewis (2001), biofilmes podem tolerar agentes antimicrobianos a concentrações de 10 a 1.000 vezes o necessário para eliminar as células planctônicas.

O contato dos pinos contendo biofilmes nos biocidas testados (item 3.1.5) foi feito transferindo-se a tampa do dispositivo, com os pinos lavados, para nova base de placa com poços (tipo ELISA), contendo 0,1 mL da solução de biocida e 0,1 mL de TSB em cada poço. Portanto, para que os biocidas fossem testados nas concentrações acima discriminadas, foi necessário o preparo das soluções com o dobro da concentração desejada devido à diluição inerente dos agentes ativos nesta etapa. A placa foi incubada por 24

horas, levando em consideração os resultados de Bardouniotis *et al.* (2001), a fim de se eliminar a interferência que pode haver na ação dos biocidas devido ao insuficiente tempo de contato com o produto contaminado (Tabela 4, item 2.6), já que alguns biocidas podem não ter efeito imediato, mas apresentar boa eficiência em um dado período após aditivção. Assim, os ensaios foram realizados após o tempo mínimo necessário de contato requerido para que os testes microbiológicos fossem representativos (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda., 2006).

Após a incubação, uma segunda lavagem foi necessária para a eliminação do excesso de biocida nos pinos. A tampa com pinos foi sonicada com 0,2 mL de TSB, em nova placa com poços, durante 30 minutos, que foi, em seguida, incubada durante 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação do crescimento celular por turbidez visual (positiva ou negativa) e por estrias/repiques confirmatórios em meios de cultura específicos para os microrganismos que aderiram aos pinos, permitiram determinar os valores da MBEC para cada biocida, ou seja, as doses mínimas para erradicação dos biofilmes formados. Os resultados obtidos foram comparados aos alcançados na determinação da MIC.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Seleção do diluente para recuperação celular

O monitoramento microbiológico de sistemas industriais é um requisito das Boas Práticas de Fabricação, fundamental para melhorar a qualidade do processo. Neste contexto, o primeiro ensaio realizado teve por objetivo selecionar o diluente de melhor abrangência na recuperação celular dos grupos microbianos mais frequentes em amostras industriais contaminadas, para padronizar o seu uso em análises microbiológicas de amostras em geral e melhor caracterizar os microrganismos presentes em fluidos de corte, objetos deste estudo. Foram utilizados cinco diluentes em amostras de distintos segmentos industriais. Os resultados obtidos para cada segmento são mostrados nas Tabelas 6 a 10.

Tabela 6: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 1 (duas amostras de aditivo para concreto).

Microrganismos	Recuperação celular nos diferentes diluentes (log UFC/mL)				
	Solução salina	Caldo Lethen	Solução de Tween-80	Água destilada	Água peptonada
Bactérias totais	6,63 ± 0,02	6,73 ± 0,09	6,64 ± 0,04	6,65 ± 0,09	6,73 ± 0,08
Coliformes	6,44 ± 0,01	5,62 ± 0,47	6,15 ± 0,05	6,84 ± 0,02	6,48 ± 0,25
Fungos	6,30 ± 0,01	6,04 ± 0,04	6,09 ± 0,04	6,40 ± 0,05	5,86 ± 0,11

Tabela 7: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 2 (seis amostras de pasta de carbonato de cálcio).

Microrganismos	Recuperação celular nos diferentes diluentes (log UFC/mL)				
	Solução salina	Caldo Lethen	Solução de Tween-80	Água destilada	Água peptonada
Bactérias totais	5,75 ± 0,09	5,73 ± 0,06	5,38 ± 0,05	6,00 ± 0,02	5,85 ± 0,09
Coliformes	5,47 ± 0,06	4,75 ± 0,06	5,00 ± 0,04	5,41 ± 0,05	5,66 ± 0,05
Fungos	4,52 ± 0,04	4,30 ± 0,06	4,30 ± 0,11	4,62 ± 0,03	4,35 ± 0,08

Para as amostras de aditivo para concreto, do segmento 1 (Tabela 6), observa-se que a melhor recuperação para bactérias totais foi apresentada tanto pela água peptonada quanto pelo caldo Letheen, enquanto o melhor desempenho na enumeração do grupo dos coliformes e dos fungos foi proporcionado pela água destilada.

Nas amostras de pasta de carbonato de cálcio, do segmento 2 (Tabela 7), a água peptonada foi o diluente mais eficiente para o grupo dos coliformes. A água destilada recuperou em maior número as células dos grupos das bactérias totais e dos fungos.

Tabela 8: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 3 (duas amostras de cola branca escolar e uma de tinta guache).

Microrganismos	Recuperação celular nos diferentes diluentes (log UFC/mL)				
	Solução salina	Caldo Letheen	Solução de Tween-80	Água destilada	Água peptonada
Bactérias totais	2,36 ± 0,04	2,70 ± 0,12	2,66 ± 0,07	2,77 ± 0,02	2,55 ± 0,08
Coliformes	6,20 ± 0,02	6,15 ± 0,06	6,14 ± 0,12	6,10 ± 0,03	6,07 ± 0,11
Fungos	6,61 ± 0,06	6,43 ± 0,04	6,11 ± 0,07	6,31 ± 0,04	6,17 ± 0,05

Tabela 9: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 4 (duas amostras de detergente doméstico).

Microrganismos	Recuperação celular nos diferentes diluentes (log UFC/mL)				
	Solução salina	Caldo Letheen	Solução de Tween-80	Água destilada	Água peptonada
Bactérias totais	7,46 ± 0,08	7,50 ± 0,05	7,39 ± 0,04	7,65 ± 0,00	7,45 ± 0,04
Coliformes	7,60 ± 0,03	7,49 ± 0,10	7,42 ± 0,05	7,38 ± 0,00	7,49 ± 0,04
Fungos	7,43 ± 0,03	7,41 ± 0,04	7,25 ± 0,06	6,63 ± 0,04	7,43 ± 0,04

Tabela 10: Resultados médios de recuperação celular para amostras do segmento 5 (cinco amostras de fluido de corte).

Microrganismos	Recuperação celular nos diferentes diluentes (log UFC/mL)				
	Solução salina	Caldo Lethen	Solução de Tween-80	Água destilada	Água peptonada
Bactérias totais	8,60 ± 0,13	8,44 ± 0,07	8,60 ± 0,07	8,86 ± 0,03	8,41 ± 0,04
Coliformes	8,39 ± 0,04	8,32 ± 0,06	8,40 ± 0,06	8,49 ± 0,03	8,19 ± 0,09
Fungos	8,22 ± 0,04	8,25 ± 0,06	7,73 ± 0,17	7,89 ± 0,05	7,66 ± 0,03

Para as amostras de cola branca escolar, os resultados observados na Tabela 8 mostram que o melhor desempenho na recuperação de bactérias totais foi obtido com o uso da água destilada. O grupo dos coliformes e dos fungos foram melhor recuperados com a solução salina.

Os resultados obtidos com as amostras de detergente doméstico (Tabela 9) indicam que os grupos das bactérias totais, coliformes e fungos apresentaram maior recuperação celular com os diluentes água destilada, solução salina e água peptonada, respectivamente.

De acordo com a Tabela 10 (amostras de fluido de corte), a água destilada apresentou melhor desempenho para as bactérias totais e para os coliformes, já o caldo Lethen foi o diluente mais efetivo na recuperação dos fungos.

Levando-se em consideração a recuperação celular dos grupos microbianos, englobando todos os segmentos industriais analisados, os melhores resultados apresentados para a recuperação de bactérias totais foram obtidos com o uso da água destilada, enquanto o grupo dos coliformes apresentou melhor recuperação tanto com a água destilada quanto com a solução salina. Para os fungos, a água destilada e a solução salina foram mais eficazes.

Portanto, de uma maneira geral, a água destilada apresentou ótimo perfil de recuperação celular, pois propiciou melhor desempenho em três dos cinco segmentos industriais analisados. Além disto, tem como vantagem ser o diluente que não requer preparação especial e é de menor custo dentre os testados. Assim, a utilização da água destilada como diluente em amostras diferenciadas possivelmente não conduz a erros de

análise apreciáveis, sendo, portanto, este o diluente selecionado para a metodologia em estudo, nos ensaios relativos à recuperação celular.

Parte dos resultados apresentados neste item foi publicada nos Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Sinaferm, realizado em Recife, de 2 a 5 de agosto de 2005 (Capelletti *et al.*, 2005).

4.2- Grupos de microrganismos predominantes em fluidos de corte mineral

Para que se tivesse uma noção global do nível de contaminação em amostras industriais e do perfil dos contaminantes, foram analisadas 163 amostras de nove indústrias que fazem uso de fluido de corte mineral. Dentre estas, a quantidade de amostras contaminadas foi de 33% em relação ao limite aceitável de contaminantes para este segmento de mercado industrial, em que são consideradas como satisfatórias as amostras com contagem inferior a 10^4 UFC/mL para cada grupo microbiano analisado. A manutenção da contaminação microbiana inferior a este nível ao longo do tempo propicia a reciclagem contínua do fluido de corte sem acarretar problemas ao sistema, de acordo com os históricos observados em diferentes indústrias (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda., 2006).

Os resultados obtidos evidenciam que a parcela de amostras contaminadas em comparação às amostras sem contaminação é significativa, principalmente por estas indústrias terem como prática o uso de biocidas para o controle do sistema.

Geralmente, quando a concentração de um dado grupo de microrganismo é superior a 10^4 UFC/mL no fluido de corte, a formação de biofilmes é freqüentemente constatada, e neste caso, o retorno aos níveis satisfatórios de contaminação torna-se dificultado.

A percentagem de contaminação por variados grupos de microrganismos foi analisada nas nove indústrias, e as médias obtidas são apresentadas na Figura 5.

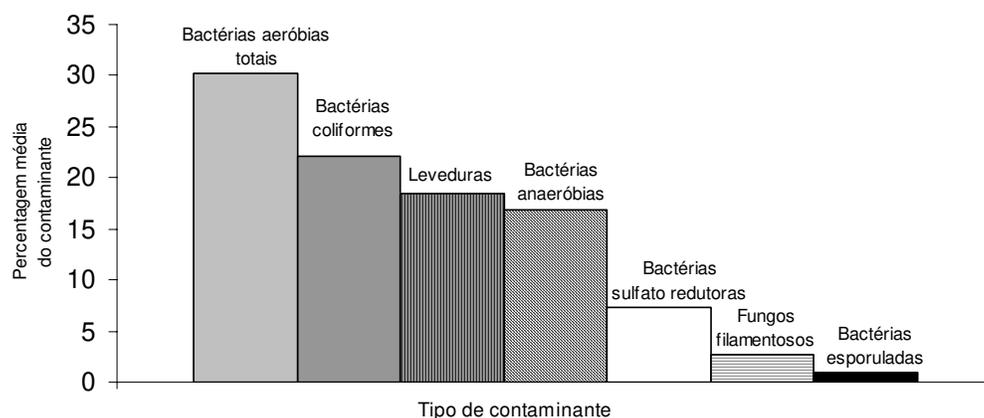


Figura 5: Análise microbiológica em amostras de fluido de corte mineral.

Dentre as amostras contaminadas, o grupo de microrganismos majoritariamente encontrado foi o das bactérias aeróbias totais, representando 30,2% da microbiota presente nas amostras. O segundo grupo mais freqüente foi o das enterobactérias (coliformes), que constituem um subgrupo das bactérias aeróbias, e são anaeróbios facultativos.

Quando o sistema de distribuição da emulsão cessa, as bactérias aeróbias rapidamente utilizam o oxigênio dissolvido no meio, mantendo condições favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos anaeróbios (estrictos e facultativos). Após o esgotamento do oxigênio, as bactérias anaeróbias crescem e são responsáveis pelo odor de sulfeto de hidrogênio na emulsão, conhecido como “*Monday Morning Odor*” (Milacron Marketing Co., 1999). A presença de bactérias planctônicas anaeróbias em sistemas com oxigenação mostra que espécies aeróbias e anaeróbias podem coexistir, e que nichos específicos para cada um destes grupos são presentes no sistema. Estas bactérias podem, possivelmente, ser provenientes do desprendimento de biofilmes.

A presença de coliformes indica que microrganismos comumente associados a más condições de higiene, e com potencial de risco patogênico podem estar presentes. A origem desta contaminação pode ser tanto fecal quanto ambiental (provavelmente da água utilizada). Este grupo também causa odor desagradável ao fluido de corte.

As bactérias sulfato-redutoras fazem parte do grupo das bactérias anaeróbias, e têm como principal característica a grande capacidade de causar corrosão. Podem sobreviver em

condição de aerobiose, permanecendo em estado latente por tempo prolongado, e a partir do momento em que há redução da tensão de oxigênio, estas voltam a proliferar (Pintado e Montero, 1986).

A baixa incidência de fungos nas amostras analisadas pode ser explicada pela observação de Runge e Duarte (1989) que cita que quando a contaminação por bactérias é elevada, o crescimento de fungos em suspensão é comprometido. Tal fato pode ser atribuído à alta densidade populacional no meio (limitante físico de crescimento) ou ao pH desfavorável à proliferação dos fungos.

Os fungos filamentosos frequentemente estão associados a entupimento de canais e prejuízos no fluxo de emulsão através das tubulações e calhas. Biofilmes bacterianos facilitam a adesão destes fungos, que preferencialmente se desenvolvem em superfícies (Milacron Marketing Co., 1999). Em contraste, o desenvolvimento de leveduras é favorável no seio do fluido.

Em relação à presença de bactérias esporuladas, estas ficam em estado latente até que as condições nutricionais do meio sejam adequadas para o seu desenvolvimento ou até que uma mudança drástica das condições em que se encontram as façam retornar a seu estado metabólico vegetativo.

Assim, tendo como referência que após duas semanas de uso os fluidos de corte não tratados com biocidas geralmente apresentam concentração bacteriana em torno de 10^9 UFC/mL (Runge e Duarte, 1989), o controle, principalmente das bactérias aeróbias planctônicas, nos primeiros estágios de uso, é imprescindível para que a formação de biofilmes seja evitada.

4.3- Caracterização do fluido de corte amostrado

O fluido de corte (emulsão óleo/água a 5% v/v), objeto deste trabalho, sem uso e após utilização por dois anos na usinagem de metais, apresentando ainda estabilidade em emulsão, foi caracterizado quanto ao grau de contaminação, pH, viscosidade e densidade. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Propriedades dos fluidos de corte sem contaminação e contaminado.

Caracterização	Fluido de corte sem contaminação	Fluido de corte contaminado
Bactérias aeróbias totais (log UFC/mL)	< 2,00	9,47 ± 0,05
Coliformes (log UFC/mL)	< 2,00	5,34 ± 0,03
Bactérias anaeróbias (log UFC/mL)	< 2,00	5,00 ± 0,00
Bactérias sulfato-redutoras (log UFC/mL)	< 2,00	3,00 ± 0,00
Fungos (log UFC/mL)	< 2,00	< 2,00
Viscosidade (Cp)	3	48
Densidade (g/mL)	1,00	0,99
pH	9,68	6,71

Em relação à análise microbiológica, a amostra contaminada apresentou um alto grau de contaminação bacteriana, sendo 10^9 UFC/mL de bactérias aeróbias totais e dentre estas, 10^5 UFC/mL foram identificadas como sendo pertencentes ao grupo coliformes. De acordo com Christensen e Characklis (1990), um elevado número de bactérias aeróbias presentes na fase aquosa aumenta a probabilidade de ocorrer a formação de biofilmes no sistema, pois estas são consideradas colonizadoras primárias de superfícies sólidas.

Bactérias anaeróbias também estavam presentes em grande concentração, e dentre estas, houve a detecção de bactérias do tipo sulfato-redutoras. Fungos não foram detectados no fluido de corte amostrado.

Quando as amostras sem contaminação e contaminada são comparadas, observa-se que a densidade do fluido praticamente não foi afetada, enquanto o pH sofreu apreciável redução e a viscosidade aumentou drasticamente. As prováveis razões para tais modificações nas propriedades originais do fluido quando há contaminação microbiana estão relacionadas à produção de metabólitos celulares, majoritariamente ácidos, que reduzem o valor do pH, enquanto a viscosidade consideravelmente mais elevada pode ter origem pela presença do alto grau da população microbiana, aos detritos de lise celular e ao EPS produzido pelas células (Runge e Duarte, 1989).

É aceito, pelas indústrias que utilizam fluido de corte, que o mesmo possa ainda ser utilizado satisfatoriamente quando com pH acima de 8,7. A tolerância para seu uso com valor entre 7,8 e 8,7 exige a adição de biocidas para controlar o grau de contaminação, e a

correção do pH com agentes alcalinizantes. Para valores de pH inferiores a 7,8 é realizada a troca do material. Em relação à viscosidade, quando esta se encontra elevada, a circulação do fluido pelos maquinários é mais difícil e a usinagem das peças é prejudicada (Runge e Duarte, 1989).

Devido às condições estabelecidas para o monitoramento e uso do fluido de corte, a indústria fornecedora do material contaminado, utilizado no presente estudo, o descartou e substituiu por novo produto.

Os ensaios descritos a seguir, efetuados com a amostra deste material descartado, tiveram como propósito a verificação da possibilidade de evitar ou minimizar as condições para que o descarte ocorra, adaptando-se a metodologia para a erradicação dos biofilmes formados nestas condições. Caso o intuito seja atingido, os fluidos poderiam ser recuperados ou reconstituídos com novos componentes livres de contaminação, diminuindo o custo e o prejuízo ambiental com o descarte do mesmo.

4.4- Contaminantes planctônicos aeróbios na amostra

A Tabela 12 mostra os resultados da caracterização dos microrganismos planctônicos aeróbios presentes no fluido de corte avaliado. Tais cepas foram selecionadas com base nas diferenças morfológicas aparentes em meio de cultura sólido (TSA).

O teste de coloração de Gram foi efetuado com todos os microrganismos isolados da amostra contaminada (43 cepas bacterianas), as quais passaram pelo primeiro repique após o isolamento. O teste de degradação de hidrcarboneto foi efetuado somente com 37 cepas, devido à presença de seis microrganismos, possivelmente fastidiosos ou mesmo não-cultiváveis (14% dos isolados), que não puderam ser reativados a partir do repique utilizado para o teste de coloração de Gram. Microrganismos desta natureza são considerados como culturas viáveis não cultiváveis, freqüentemente encontrados em amostras ambientais e em biofilmes, cuja adaptação é quase sempre restrita ao meio em que se encontram, por não resistirem ao processo laboratorial de rotina (repique de culturas puras em meios de cultura tradicionais), necessário aos experimentos (Arcuri, 2000). Assim, as cepas isoladas não representam em número ou em variedade o total presente neste meio, mas sim, ocorre o favorecimento de grupos com crescimento rápido e com melhor adaptação às condições de cultivo utilizadas em laboratório (Streit *et al.*, 2004). Para se determinar as condições

ótimas de crescimento de um dado microrganismo, considera-se o ambiente no qual o mesmo é frequentemente encontrado. Contudo, uma das dificuldades do cultivo em laboratório é a avaliação do meio em que este vive, uma vez que, por exemplo, 1 cm³ de solo pode conter uma variada gama de microambientes.

Tabela 12: Cepas aeróbias isoladas na amostra de fluido de corte contaminado.

Característica	Total de cepas
Gram-positivas	1
Gram-negativas	42
Bactérias não cultiváveis / fastidiosas	6
Bactérias degradadoras de hidrocarboneto	23

O predomínio das bactérias Gram-negativas na amostra de fluido de corte (97,7%) está de acordo com as informações obtidas em literatura. Bactérias Gram-positivas são pouco comuns em fluidos de corte, com adaptação de até uma semana para crescerem. Em contraste, as bactérias Gram-negativas crescem em apenas dois dias neste meio (Milacron Marketing Co., 1999). A presença majoritária deste grupo indica que os contaminantes podem apresentar facilidade de adesão a superfícies, devido à grande frequência de espécies com apêndices celulares, além da maior capacidade de adaptação e mutação genética que as bactérias Gram-positivas. Este potencial particular do grupo caracteriza os microrganismos pertencentes a ele como prováveis causadores de problemas microbiológicos, principalmente na formação de biofilmes (Christensen e Characklis, 1990). Outra característica distinta deste tipo celular é a composição da membrana externa da parede celular, que contém elevado conteúdo de lipídeos e de lipoproteínas, além da presença de espaço periplasmático, aspectos considerados importantes na resistência à penetração das substâncias ativas dos biocidas.

A Figura 6 ilustra os resultados de referência para o teste de degradação de hidrocarboneto.

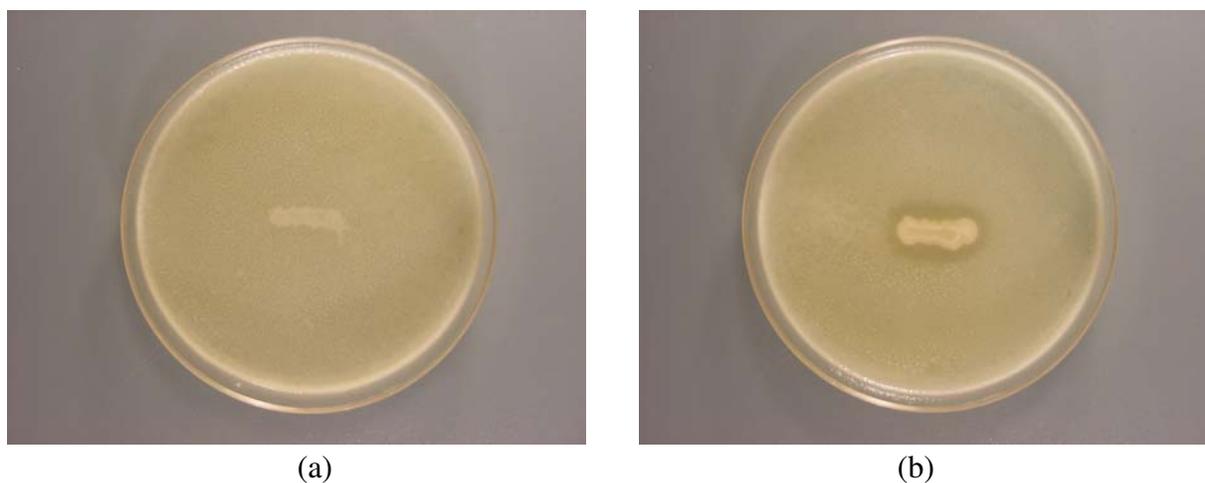


Figura 6: Padrão dos resultados para o teste de degradação de hidrocarboneto. (a) resultado negativo e (b) resultado positivo.

A característica de degradação de hidrocarboneto foi majoritária dentre os microrganismos presentes no fluido de corte amostrado (62,2% do total de cepas cultiváveis). As conseqüências desta atividade metabólica (consumo do carbono), observadas pelos manipuladores na indústria, são a ocorrência da desestabilização da emulsão (separação das fases aquosa e oleosa), a modificação das suas propriedades físico-químicas (conforme observado no item 4.3, Tabela 11), e a interferência direta na qualidade do material usinado (Morton, 1987). Além destas, as alterações causadas pela presença destes microrganismos, mesmo estando a baixas concentrações, são mais rápidas e intensas que as observadas por contaminantes sem esta característica, o que contribui para a deterioração do fluido de corte a curto prazo e praticamente inviabiliza sua recuperação se a deterioração é muito intensa.

Os hidrocarbonetos podem ser inativos, inibidores ou estimulantes para os microrganismos (Lima, 1975). Os microrganismos podem utilizar hidrocarbonetos como única fonte de matéria orgânica para o desenvolvimento de seus processos vitais. Algumas bactérias usam asfalto e fenóis, substâncias consideradas como xenobióticas ou mesmo microbicidas. Do imenso número de microrganismos conhecidos, apenas uma centena de gêneros é citada na literatura como sendo capaz de utilizar hidrocarbonetos em seu metabolismo. A maioria é constituída por bactérias, havendo também fungos filamentosos e leveduras. As algas têm importância na formação do petróleo, mas não são citadas como

utilizadores de hidrocarbonetos. Dentre os microrganismos citados, três grupos foram mais estudados pela comunidade científica por serem importantes em sua atividade nos processos naturais: *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. oleovorans*, *P. boreopolis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. methanica*), *Desulfovibrio* (*D. desulfuricans*, *D. aestuarii*), *Actinomicetos* (gêneros *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*).

Em estudos realizados em meios de fermentação com hidrocarbonetos, são comumente relatados como produtos finais da atividade microbiana outros hidrocarbonetos mais simples, ácidos, álcoois e cetonas. Alguns microrganismos oxidam o hidrocarboneto mais completamente, até dióxido de carbono e água. Esta ação, quando não sujeita a controle, pode levar a prejuízos como, por exemplo, à deterioração de combustíveis, produção de sulfetos nos gases naturais, decomposição de lubrificantes, corrosão e outros (Lima, 1975).

A capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos, que ocorre em algumas populações de microrganismos nativas em ambientes poluídos com óleo, deve-se, segundo Leahy e Colwell (1990) a três mecanismos inter-relacionados: indução e/ou repressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e seleção de cepas capazes de transformar tais compostos.

4.5- Concentrações inibitória mínima e de morte das células planctônicas

A concentração inibitória mínima do biocida (MIC) corresponde à quantidade necessária para que haja a diminuição do metabolismo celular dos contaminantes, impedindo o aumento da proliferação microbiana, enquanto a concentração mínima de morte (CMM) se refere à quantidade do biocida que elimina os microrganismos.

Estes testes são imprescindíveis para controlar o grau de contaminação por células planctônicas, reduzindo a possibilidade de que as mesmas formem biofilmes e que o fluido se desestabilize pelo excesso de contaminantes.

Os valores encontrados neste ensaio melhor direcionam a adição do biocida, de forma que este não seja utilizado em quantidade além da necessária (onerando o custo de operação e causando toxicidade aos manipuladores), e nem abaixo da dosagem de atividade (falsa segurança no controle microbiológico).

A Tabela 13 apresenta os resultados de MIC e de MMC obtidos para cada biocida testado na amostra de fluido de corte contaminado em estudo.

Tabela 13: Determinação da MIC e da CMM para os contaminantes planctônicos da amostra de fluido de corte.

Biocida	Concentração recomendada (% v/v)	Faixa testada (% v/v)	MIC (% v/v)	MMC (% v/v)
FBP-124	0,15	0,22 - 0,003	0,056	0,056
FBP-128	0,10	0,15 - 0,002	0,075	0,075
FBP-140	0,15	0,22 - 0,003	0,007	0,028
FBP-417	0,50	0,75 - 0,011	0,093	0,093
BNP-115	0,30	0,45 - 0,007	0,014	0,014
BP-180	0,12	0,18 - 0,003	0,045	0,045
BP-509	0,20	0,30 - 0,046	0,075	0,075

As concentrações recomendadas para todos os biocidas testados mostraram-se adequadas para inibir o metabolismo e eliminar os contaminantes planctônicos na amostra, indicando que neste caso não há presença de microrganismos resistentes ao tratamento convencional. Um estudo realizado por Ludensky (2003) com uma cepa de *Sphaerotilus natans*, importante constituinte de biofilmes em trocadores de calor e em sistemas de fabricação de papel, mostrou que a mesma, em forma planctônica, desenvolveu resistência aos biocidas a que foi exposta, em concentrações subletais, em um período de 10 semanas. Assim, a ausência de microrganismos resistentes no sistema aqui estudado indica que o mesmo estava sendo tratado com dosagens adequadas de biocida para a eliminação de células planctônicas. Provavelmente a falta de controle na concentração microbiana do fluido de corte está vinculada à presença de biofilmes em equipamentos e tubulações, que podem recontaminar rapidamente o produto.

A indicação para a concentração de uso dos biocidas é baseada na quantidade de princípio ativo em cada formulação, portanto, o biocida que apresentou melhor resultado em relação à respectiva concentração de uso foi o BNP-115 (com o menor valor de MMC),

sendo efetivo contra as bactérias planctônicas a uma concentração de 4,7% da dosagem de uso, deixando um residual de ativos de 95,3% disponíveis no fluido para aumentar o tempo entre as adições dos agentes antimicrobianos, que, na prática, ocorre uma vez por semana.

O biocida FBP-140 apresentou ação bacteriostática mais pronunciada que os demais, por requerer concentração quatro vezes maior que a inibitória para eliminar os contaminantes da amostra, além de ter apresentado o menor valor para promover a inibição do crescimento dos microrganismos (MIC). Isto se deve provavelmente ao fato deste biocida conter em sua formulação somente um agente ativo, o piritionato de sódio, que conceitualmente apresenta caráter bacteriostático até mesmo em altas concentrações (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda., 2006).

Os biocidas FBP-128 e BP-509 apresentaram os mesmos valores, tanto para MIC quanto para MMC. Porém, para o BP-509 é recomendado que se utilize uma maior quantidade em relação ao FBP-128 para que o residual de ativos (margem entre a concentração necessária e a de uso) possibilite a atividade nestas condições, já que a ação proporcionada pelo sinergismo dos seus princípios ativos tende a ser mais rápida contra os microrganismos (IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda., 2006).

Os biocidas testados, em ordem crescente de concentração necessária para eliminar as células planctônicas em relação às suas respectivas concentrações de uso foram: BNP-115 (4,7%), FBP-140 e FBP-417 (18,6%); FBP-124, BP-180, BP-509 (37,5%) e FBP-128 (75%).

4.6- Preservação da emulsão após subseqüentes recontaminações

Este ensaio teve como objetivo complementar a avaliação da efetividade dos biocidas testados, utilizando a amostra de fluido de corte contaminado (10^9 UFC/mL) devidamente aditivada, visto que o controle do grau de contaminação dos microrganismos planctônicos é essencial para prevenir a formação de biofilmes. Amostras do fluido de corte foram aditivadas com os respectivos biocidas e foram submetidas a reinoculações propositais a cada 2 dias com os próprios contaminantes nativos da amostra original. Assim, houve uma simulação da constante contaminação verificada no ambiente industrial. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14: Contagem microbiana das amostras com diferentes biocidas a cada intervalo de ensaio.

Biocida adicionado	Período do ensaio e contagem microbiana (log UFC/mL)				
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias	* 10 dias
FBP-124 - 0,15%	2,81 ± 2,12	2,48 ± 0,21	2,40 ± 0,42	2,54 ± 0,08	2,40 ± 0,21
FBP-128 - 0,10%	3,56 ± 2,83	2,18 ± 1,75	2,00 ± 0,00	2,18 ± 0,21	2,18 ± 0,21
FBP-140 - 0,15%	> 7,00 ± 0,00	> 7,00 ± 0,00	> 7,00 ± 0,00	> 7,00 ± 0,00	> 7,00 ± 0,00
FBP-417 - 0,50%	2,00 ± 1,41	< 2,00 ± 1,41	< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00	2,90 ± 0,00
BNP-115 - 0,30%	2,74 ± 3,54	2,87 ± 0,04	< 2,00 ± 0,07	< 2,00 ± 0,04	< 2,00 ± 0,00
BP-180 - 0,12%	< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 1,41	< 2,00 ± 1,41	< 2,00 ± 0,00	2,78 ± 0,10
BP-509 - 0,20%	2,65 ± 2,12	2,70 ± 0,00	2,78 ± 0,10	2,60 ± 0,00	3,60 ± 0,14

* Contagem após inóculo dobrado de 1000 µL/amostra.

O bom desempenho de cada biocida durante o período do ensaio permitiu determinar com boa margem de segurança a confiabilidade na dosagem recomendada e estabilidade do grau de contaminação do fluido de corte, até nova adição de biocida, que é geralmente realizada semanalmente.

O biocida BP-180 apresentou melhor desempenho inicial na redução dos contaminantes, mantendo-a durante oito dias, com contagem final satisfatória de 6×10^2 UFC/mL na emulsão. O BP-509 apresentou contagem superior, em 1 unidade logarítmica, após o reinóculo mais concentrado, porém não ultrapassou o limite requerido, atingindo 10^3 UFC/mL.

De uma maneira global, todos os biocidas mantiveram a concentração celular controlada abaixo de 10^4 UFC/mL, independentemente do reinóculo mais concentrado (1.000 µL / 50 g de amostra) introduzido após a contagem no oitavo dia, com exceção do FBP-140. Para este biocida, a concentração residual na emulsão após a diminuição da carga microbiana inicial não foi suficiente para impedir a contaminação após os reinóculos.

Tais resultados indicam que o residual de biocida (diferença resultante entre o valor da MIC e a concentração de uso) pode proporcionar baixa vulnerabilidade do sistema à contaminação, evitando a necessidade de adicionar grandes quantidades de biocida no tratamento de fluido deteriorado. Com isto, o controle microbiológico torna-se mais efetivo,

além de espaçar os intervalos para nova adição de biocida, e de aumentar o período de vida útil do fluido de corte em uso.

4.7- Formação de biofilmes no sistema MBEC™

4.7.1- Avaliação da adequação do inóculo

4.7.1.1- Inoculação com a amostra contaminada

Como referência, Olson *et al.* (2002) recomendam o período de até 24 horas para a formação de biofilme (10^6 UFC/pino) com inóculos formados por culturas puras, em suspensão de aproximadamente 10^8 UFC/mL. No caso da amostra de fluido de corte contaminado inicialmente com $2,9 \times 10^9$ UFC/mL por variados tipos microbianos, houve a geração de biofilme com 10^6 UFC/pino a partir de 24 horas, como mostra a Figura 7, resultado este considerado satisfatório. Este período foi superior ao pré-determinado para várias culturas puras, o que era esperado, devido provavelmente ao fato de que quando o inóculo é formado por variados tipos microbianos, as cepas podem apresentar distintos tempos de crescimento, além da adaptação dos microrganismos ali presentes (expostos à condição propícia para a formação de biofilme), e também a competição entre os mesmos para o estabelecimento de um novo nicho (adesão no suporte do dispositivo de ensaio).

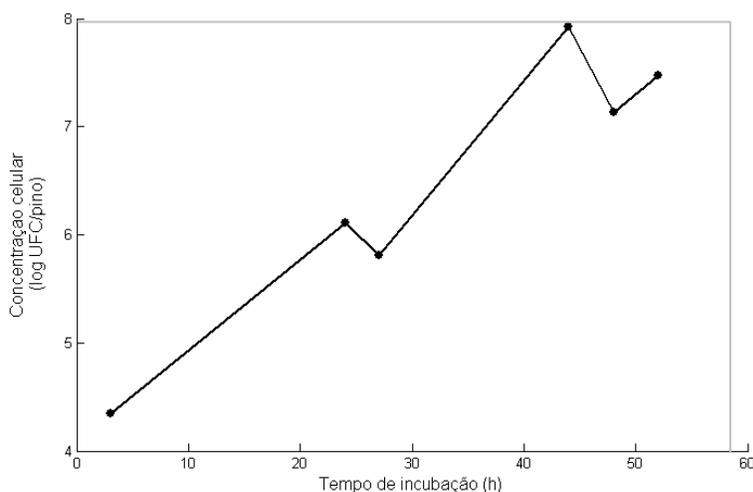


Figura 7: Cinética de formação do biofilme no dispositivo MBEC™, com amostra de fluido de corte contaminada (inóculo 1).

Nota-se que há uma tendência no comportamento celular durante a formação do biofilme, em ciclos repetitivos. No período inicial, ocorre crescimento progressivo do biofilme e posteriormente ocorre queda no número de células aderidas, supostamente decorrente de morte celular por processo natural. No ciclo consecutivo, o processo de adesão progride, até que novamente a etapa de redução na quantidade de células se instale, porém mais bruscamente, podendo significar uma fase de amadurecimento do biofilme. Assim, aumentam as populações microbianas que encontrarem melhores condições de sobrevivência, e diminuem aquelas que são mais fracas ou inadequadas, seguindo a lei da seleção natural.

Apesar da ocorrência de queda na adesão celular em determinados períodos de formação do biofilme, o número de células não caiu abaixo de 10^6 UFC/pino após 27 horas. A metodologia utilizada, portanto, mostrou-se efetiva com o uso do inóculo 1, atingindo e mesmo excedendo a quantidade mínima de células aderidas necessárias para os ensaios de susceptibilidade (10^6 UFC/pino).

A Tabela 15 mostra quais foram os grupos de microrganismos que aderiram aos corpos de prova do dispositivo MBEC™, após 48 horas de incubação.

Tabela 15: Microbiota presente nos pinos do dispositivo MBEC™.

Tipos de microrganismos	Concentração relativa de células aderidas (log UFC/pino)
Bactérias totais	7,10 ± 0,07
Coliformes	4,90 ± 0,07
Bactérias anaeróbias	3,00 ± 0,00

Bactérias sulfato-redutoras não foram detectadas na forma aderida aos pinos. De acordo com um trabalho realizado por Almeida *et al.* (2002), o mesmo ocorreu com bactérias sulfato-redutoras detectadas na fase planctônica em um sistema de resfriamento de refinaria (em torno de 10^2 cel/mL), as quais não estavam presentes no biofilme formado a partir da mesma fonte. No caso do fluido de corte contaminado, este fato pode ser devido provavelmente à sua baixa concentração encontrada na fase planctônica em relação aos

demais contaminantes, podendo ter ocorrido o processo de competição natural entre os mesmos e o não-favorecimento da minoria na formação de biofilmes. Também se pode considerar que este grupo não apresente uma forte capacidade de adesão ao material do dispositivo de ensaio (acrílico), comparadamente aos demais microrganismos.

A presença de bactérias do tipo anaeróbias mostram que o biofilme formado contém a estrutura requerida para ser submetido aos ensaios pretendidos, visto que biofilmes maduros contém baixa concentração de oxigênio disponível em sua parte interna. Pode-se atribuir a este fato à baixa difusão de oxigênio que é dificultada pelas camadas externas, e à sua taxa de utilização pelos microrganismos superficiais ser muito alta (Allison *et al.*, 2000).

4.7.1.2- Inoculação com a suspensão contendo os microrganismos isolados

O inóculo 2, testado no presente ensaio, foi submetido à formação de biofilme para que se pudesse avaliar se o isolamento dos microrganismos presentes na amostra diferenciaria no desempenho apresentado pelo inóculo 1, onde a interação entre os microrganismos não foi alterada. O procedimento de isolamento é muito comum em laboratórios de microbiologia para a realização de experimentos, mas geralmente contrasta com a realidade apresentada pela maioria dos ambientes naturais.

Os microrganismos isolados, contaminantes da amostra de fluido de corte original, que foram colocados artificialmente em consórcio em proporções iguais constituindo um inóculo inicial de 1×10^9 UFC/mL, não atingiram a concentração de células aderidas de 10^6 UFC/pino em até 72 horas de incubação, chegando apenas a 10^3 UFC/pino (Figura 8). Ao final deste período, foi verificado o grau de crescimento microbiano no fluido submetido ao cisalhamento, sendo detectadas 2×10^8 UFC/mL, ou seja, o farto número de células planctônicas disponíveis para a adesão, neste caso, não contribuiu para o aumento da quantidade de células aderidas.

Estes resultados corroboraram com os resultados obtidos por Olson *et al.* (2002), que verificaram que algumas bactérias, embora viáveis *in vitro*, não formaram biofilme em condições padrão de cultivo, sendo necessária a adição de meio de cultura para o enriquecimento das cepas antes da submissão ao processo de adesão. Uma vez atendida esta condição, e submetidas à formação de biofilmes, tais bactérias requereram um tempo maior para aderir aos pinos, entretanto, formaram biofilmes com sucesso.

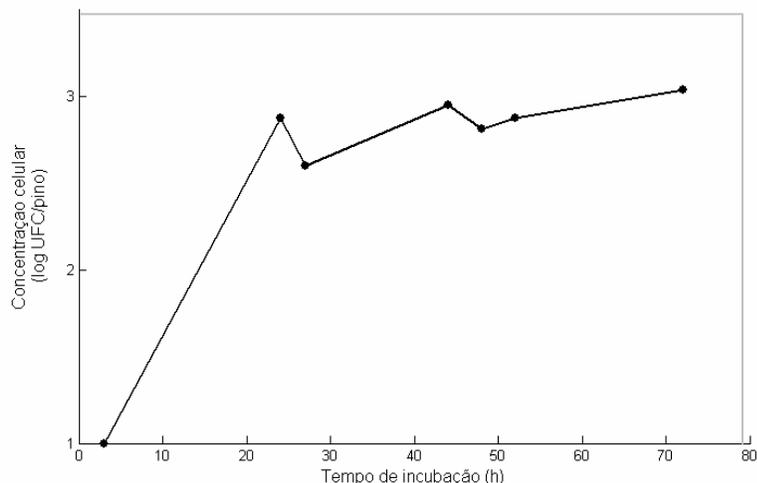


Figura 8: Cinética de formação do biofilme no dispositivo MBEC™, com os microrganismos isolados (inóculo 2).

Para descartar a hipótese de que as cepas sob estudo poderiam estar debilitadas, o processo de enriquecimento com o uso do meio TSB foi efetuado, acrescido do preparo de um novo inóculo mais concentrado (1×10^{10} UFC/mL). Após a repetição do ensaio sob tais condições, verificou-se que a adesão celular foi similar à anteriormente obtida sem o meio TSB, indicando que a não-formação de biofilme independe da concentração inicial do inóculo para concentrações a partir de 10^6 UFC/mL.

Uma hipótese para este fato é que por mais criterioso que seja o procedimento de isolar os microrganismos, é muito difícil resgatar a totalidade da diversidade microbiana envolvida na formação do biofilme original, e o processo de isolamento pode ter rompido a proporcionalidade e interação entre espécies. Assim, as características originais do bio-sistema foram afetadas, alterando a capacidade de adesão, visto que o inóculo 1 (amostra de origem do inóculo 2) foi utilizado satisfatoriamente como meio para a obtenção de células aderidas.

Desta forma, o inóculo 2 (suspensão produzida a partir de microrganismos isolados) não se mostrou apropriado para a formação efetiva de biofilmes *in vitro*, que requer uma quantidade mínima de células aderidas de 10^6 UFC/pino para que haja a necessária maturação e produção de EPS pelos microrganismos e assim ser submetido

confiavelmente a ensaios para a avaliação da susceptibilidade a biocidas visando sua erradicação.

4.7.2- Períodos de formação e de sonicação do biofilme

No intuito de avaliar a equivalência dos biofilmes formados no dispositivo MBEC™, a contagem de células aderidas em diferentes posições dos corpos de prova (pinos) foi efetuada.

De acordo com a Figura 9, a variação da concentração de células aderidas entre os pinos, para cada período de incubação não excedeu uma ordem de grandeza (uma escala logarítmica), que é o parâmetro para a comprovação de similaridade em análises microbiológicas industriais (Pharmeuropa, 2003). Portanto, os biofilmes formados neste aparato de ensaio podem ser considerados como equivalentes em qualquer posição dos pinos que o constituem, utilizando como inóculo fluido de corte contaminado com várias espécies microbianas.

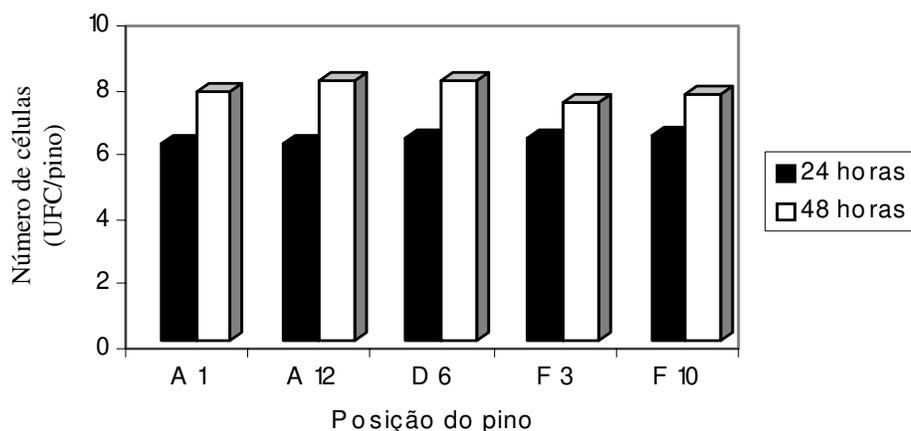


Figura 9: Avaliação comparativa entre os biofilmes formados nos pinos do dispositivo MBEC™, após 24 horas e 48 horas de incubação. A codificação utilizada para os pinos é do tipo letra e número, onde as letras indicam as colunas (A a H) e os números, as linhas (1 a 12).

Uma vez que o inóculo formado pela combinação das cepas isoladas (inóculo 2) não foi adequado para a formação de biofilmes na concentração celular esperada, somente a amostra de fluido de corte contaminado (inóculo 1) foi utilizada nos experimentos subsequentes.

O ensaio aqui descrito objetivou a otimização do procedimento experimental, com a obtenção de resultados confiáveis, no mínimo tempo possível, para que os casos de contaminação industrial sofram rápida intervenção, evitando retrabalho e desperdícios.

O contato prolongado da amostra com a superfície dos pinos no dispositivo MBEC™ propicia a formação do biofilme. A variação deste tempo de contato pode gerar biofilmes diferenciados em relação à sua estrutura (maduro ou frágil) quando o mesmo inóculo é incubado por distintos períodos. Tal adesão é constatada através da liberação das células submetendo o biofilme à sonicação. Porém, de acordo com a duração do procedimento de sonicação pode ocorrer uma boa recuperação ou lise celular, sendo vital determinar o tempo ótimo para a realização destes ensaios. O experimento seguinte foi planejado para definir o tempo de sonicação para o presente estudo.

Segundo a metodologia MBEC™, para a sonicação é recomendado o período de 5 a 30 minutos, dependendo do tipo e da potência do equipamento utilizado. Tendo esta informação como base, os ensaios foram inicialmente realizados com tempos de sonicação entre 5 e 20 minutos, com amostragens efetuadas a cada 5 minutos. Nesta faixa estudada, verificou-se que a recuperação celular aumentou progressivamente até 15 minutos, com estabilização em 20 minutos. Embora a literatura não indique um tempo superior a 30 minutos para a sonicação, foi efetuado o teste também com 40 minutos para averiguação da ocorrência de maior viabilidade ou morte celular por lise.

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos variando-se os tempos de incubação para a formação do biofilme, e de sonicação a partir de 20 minutos, utilizando fluido de corte contaminado no dispositivo MBEC™.

Tabela 16: Adesão celular em diferentes tempos de incubação do inóculo, obtida pela recuperação das células aderidas por sonicação.

Tempo de incubação (h)	Contagem microbiana nos diferentes períodos de sonicação (log UFC/mL)		
	20 minutos	30 minutos	40 minutos
24	6,11 ± 0,00	6,11 ± 0,00	6,30 ± 0,00
27	5,81 ± 0,00	5,81 ± 0,00	6,65 ± 0,07
44	8,98 ± 0,11	7,93 ± 0,04	6,40 ± 0,14
48	6,74 ± 0,06	7,13 ± 0,07	8,11 ± 0,00
52	6,84 ± 0,21	7,48 ± 0,21	8,30 ± 0,07

Observa-se que em 24 horas, o número de células atingiu o limite mínimo de células aderidas (10^6 UFC/mL) recomendado para os testes, nos três períodos de sonicação utilizados, com pequena variação (considerada desprezível) para os valores obtidos. Em 27 horas, 20 e 30 minutos de sonicação apresentaram o mesmo valor de recuperação celular, enquanto no período de 40 minutos recuperou-se uma quantidade 14,2% superior de células, mas de acordo com o estabelecido pelos laboratórios industriais (Pharmeuropa, 2003), esta diferença não é significativa. Em 44 horas, verifica-se perda celular crescente com o aumento do período de sonicação, possivelmente em decorrência de perda progressiva das células por lise. Em 48 e 52 horas, entretanto, a recuperação de células é proporcional ao tempo de sonicação, indicando momentos nos quais as células estão menos susceptíveis ao estresse gerado pelo ultrassom durante o procedimento de sonicação.

Com estes resultados, o período de escolha para a sonicação foi o de 30 minutos, por apresentar o melhor compromisso entre recuperação e perda celular.

Apesar do período de incubação de 24 horas proporcionar adesão celular mínima para o estudo, a obtenção de um biofilme mais robusto e com maior exposição às tensões de cisalhamento condiz com a realidade industrial enfocada. Em função disto, como foi observada uma menor fragilidade celular nos biofilmes formados com 48 horas e 52 horas, concluiu-se que o período mais adequado para a formação do biofilme em questão é de 48 horas. Isto permite a otimização do tempo de ensaio para agilizar a intervenção antimicrobiana no sistema contaminado por biofilmes. Outro fator determinante para tal escolha é que este mesmo período é estipulado como prazo médio de incubação para a

detecção de bactérias planctônicas, que apresentam taxa metabólica mais alta em comparação às bactérias sésseis (Jefferson, 2004), na maioria dos ensaios laboratoriais de rotina.

Assim, para o estudo do biofilme formado a partir da amostra de fluido de corte contaminado (inóculo 1), o período de incubação para a obtenção de células aderidas com 10^7 UFC/pino (quantificadas pela liberação do biofilme) foi estipulado em 48 horas, com 30 minutos de sonicação. O mesmo período de sonicação será utilizado para a contagem das células viáveis, após o ensaio de susceptibilidade aos biocidas.

4.8- Comparação da concentração mínima de biocidas para erradicação do biofilme

A determinação da concentração mínima de utilização de um dado biocida para a erradicação do biofilme (MBEC) tem o propósito de auxiliar na minimização do processo de reinstalação dos microrganismos colonizadores (adesão em superfícies), o que freqüentemente volta a ocorrer quando o tratamento é baseado em dosagens convencionais (testes para determinação da MIC e da MMC).

A eficácia de um biocida sobre biofilmes depende de diversos fatores, tais como a capacidade de adsorção e de difusão pela matriz extracelular, e interação com as células constituintes, de acordo com a composição química e modo de ação do produto. Dependendo do biocida, um dos parâmetros citados pode ter maior importância para garantir a sua atividade.

Nas etapas iniciais deste ensaio, com o intuito de averiguar se a concentração do inóculo para a formação do biofilme influenciaria na determinação da MBEC, foi utilizada a amostra tal qual foi recebida da indústria (inóculo1) e o mesmo foi diluído a 1%. Assim, o inóculo 1 iniciou o processo de adesão com 10^9 UFC/mL enquanto a amostra diluída iniciou com 10^7 UFC/mL. Porém, após 48 horas de incubação sob tensão cisalhante, a adesão quantitativa em ambas as amostras foi a mesma (10^7 UFC/pino).

Para averiguar uma das possíveis causas deste fenômeno, alíquotas da amostra com e sem agitação mecânica (equipamento Vortex) foram preparadas e enumeradas para estimar a agregação presente no fluido de corte, assim como foi verificado por Stoodley *et al.* (2001) em amostras de efluente contendo porções celulares disseminadas de um biofilme. No entanto, não houve diferença entre as duas contagens, sugerindo que não houve

carreamento de grumos durante a diluição, o que poderia favorecer a adesão nos pinos devido a um aumento não previsto de massa celular no inóculo.

Entretanto, pode ter ocorrido a diminuição de metabólitos tóxicos no meio com o procedimento de diluição, contribuindo para que as cepas ficassem menos estressadas e metabolicamente mais ativas, diminuindo, assim, o período para que a adesão ocorresse, apesar de uma menor quantidade de células planctônicas estarem presentes. Portanto, por aderirem a 10^7 UFC/pino, os dois biofilmes formados, a partir de fluido de corte concentrado (inóculo 1) e de fluido de corte diluído a 1% em fluido de corte estéril, foram submetidos aos testes de susceptibilidade a biocidas, cujos resultados estão indicados nas Tabelas 17 e 18.

Para o inóculo 1, a triagem inicial dos biocidas, em concentrações de 10, 25, 50 e 75 vezes a concentração de uso, resultou na erradicação do biofilme nas concentrações de 25, 50 e 75 vezes, para todos os biocidas testados. Assim, foram necessários ensaios suplementares para a determinação mais precisa da quantidade mínima de biocida necessária para a erradicação do biofilme, entre os valores de 10 e 25 vezes, sendo então, testadas as concentrações de 12, 16, 19 e 22 vezes a concentração de uso dos biocidas, sem haver a necessidade de detalhamento entre 10 e 12 vezes por serem valores muito próximos.

Para o inóculo 1 diluído a 1%, os resultados não foram semelhantes. O biofilme formado apresentou maior resistência aos biocidas, em comparação ao biofilme formado com a amostra concentrada. Possivelmente, a explicação mais plausível para o fato é a ocorrência da seleção de cepas menos susceptíveis, favorecidas na condição imposta pela diluição, e que aderiram aos corpos de prova. Além disto, a comunicação intercelular, denominada *quorum sensing* (Davies *et al.*, 1998), através de moléculas sinalizadoras que caracterizam as funções e aptidões de uma dada população microbiana pode ter sido afetada pela alteração na composição original da amostra.

Tabela 17: Susceptibilidade dos biofilmes formados com o inóculo 1.

Biocida	D_u (% v/v)	Crescimento microbiano em concentração de							
		biocida ($x D_u$)							
		10	12	16	19	22	25	50	75
FBP-124	0,15	+	-	-	-	-	-	-	-
FBP-128	0,10	+	-	-	-	-	-	-	-
FBP-140	0,15	+	-	-	-	-	-	-	-
FBP-417	0,50	+	-	-	-	-	-	-	-
BNP-115	0,3	+	-	-	-	-	-	-	-
BP-180	0,12	+	-	-	-	-	-	-	-
BP-509	0,20	+	-	-	-	-	-	-	-

D_u : Dosagem de uso

x: Fator de aumento da concentração D_u

(+) Presença de crescimento microbiano (-) Ausência de crescimento microbiano

Tabela 18: Susceptibilidade dos biofilmes formados com o inóculo 1 diluído a 1%.

Biocida	D_u (% v/v)	Crescimento microbiano em concentração de							
		biocida ($x D_u$)							
		10	12	16	19	22	25	50	75
FBP-124	0,15	+	+	+	+	+	-	-	-
FBP-128	0,10	+	+	+	+	+	-	-	-
FBP-140	0,15	+	+	+	+	+	+	+	-
FBP-417	0,50	+	+	+	+	+	-	-	-
BNP-115	0,30	+	+	+	+	+	+	+	+
BP-180	0,12	+	+	+	+	+	-	-	-
BP-509	0,20	+	+	+	+	+	+	+	+

D_u : Dosagem de uso

x: Fator de aumento da concentração D_u

(+) Presença de crescimento microbiano (-) Ausência de crescimento microbiano

A partir de tais resultados, as concentrações inibitórias mínimas foram determinadas. A Tabela 19 apresenta os resultados de MBEC obtidos para cada biocida testado, na amostra de fluido de corte contaminado (inóculo 1) e na mesma após diluição a 1%.

Tabela 19: Determinação da MBEC para o biofilme formado a partir do inóculo 1 e a partir do mesmo diluído a 1%.

Biocida	MBEC (% v/v)	
	Inóculo 1	Inóculo 1 diluído
FBP-124	1,8	3,75
FBP-128	1,2	2,5
FBP-140	1,8	11,2
FBP-417	6,0	12,5
BNP-115	3,6	> 22,5
BP-180	1,4	3,0
BP-509	2,4	> 15,0

Mediante os resultados apresentados, para o biofilme formado a partir do fluido de corte contaminado concentrado, não houve diferença significativa entre os biocidas testados em relação ao valor da concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC), pois os valores foram 12 vezes superiores à concentração de uso recomendada.

O biocida FBP-128 apresentou os melhores valores de MBEC para ambos os inóculos, porém a quantidade requerida foi duas vezes superior para o inóculo diluído a 1% em relação ao inóculo concentrado. O biofilme formado a partir da amostra diluída a 1% foi muito resistente aos biocidas testados, apresentando valores superiores de erradicação, sendo que as concentrações testadas dos biocidas BNP-115 e BP-509 não foram suficientes para erradicar este biofilme.

Com base em estudos publicados a este respeito, a maior resistência apresentada pelo inóculo diluído pode ser atribuída ao metabolismo celular, que pode variar de acordo com as condições do meio em que a célula se encontra. Quando a amostra concentrada foi

diluída, as células passaram a se dividir mais rapidamente. A partir de então, pode ter ocorrido privação ou limitação de um nutriente em particular, que estava presente na amostra concentrada, fazendo com que seu metabolismo e taxa de crescimento diminuíssem novamente. Segundo Mah e O'Toole (2001), a transição da taxa exponencial de uma célula para uma baixa ou mínima taxa de crescimento é geralmente acompanhada por um aumento de sua resistência a antibióticos. Bactérias com tal característica também podem estar presentes em biofilmes, principalmente em sua região interna.

Em um estudo realizado com *Pseudomonas aeruginosa* apresentando baixa taxa de crescimento, tanto sob a forma planctônica quanto em biofilme, constatou-se que estas foram igualmente resistentes ao tratamento com antibióticos. Quando a taxa de crescimento de ambas as formas foi aumentada, as células planctônicas se tornaram mais susceptíveis que as células em biofilme expostas ao mesmo antibiótico. Um outro estudo similar foi desenvolvido para a comparação da resistência de *Burkholderia cepacia* em forma planctônica e em biofilme, nas diferentes fases de crescimento microbiano. O aumento da resistência foi observado quando da proximidade da fase estacionária, atingindo valor máximo nesta fase, para ambas as culturas (Mah e O'Toole, 2001).

Apesar dos interessantes resultados obtidos com a amostra diluída, optou-se por dar continuidade ao trabalho com o inóculo concentrado, visto que o comportamento do inóculo diluído deve ser melhor elucidado, inclusive com embasamento teórico e técnico pertinentes. Assim, considerou-se que o inóculo 1 é ainda o melhor representante da real condição em que as células se encontram.

Para os ensaios anteriores foi possível obtermos resultados satisfatórios a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, que corresponde à temperatura ótima para o cultivo da maioria dos microrganismos. Para consolidar o uso do inóculo 1, o mesmo foi avaliado empregando-se alternativamente a temperatura de incubação de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, visto que nesta condição tem-se uma maior aproximação da temperatura média de trabalho com a emulsão na indústria (Allsopp, 1986). Observou-se que não houve diferença significativa na enumeração das células aderidas em relação ao biofilme obtido a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ambas em torno de 7 log UFC/pino) e nos grupos microbianos aderidos. Portanto, também procedeu-se ao ensaio de erradicação com o biofilme formado em temperatura inferior. Os biocidas foram testados em concentrações próximas das obtidas na erradicação do biofilme formado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, para análise comparativa, e os resultados são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20: Erradicação do biofilme formado a partir do inóculo 1, ensaiado a $25\pm 2^\circ\text{C}$.

Biocida	Crescimento microbiano em concentração de biocida ($\times D_u$)		
	10	12	16
FBP-124	+	-	-
FBP-128	+	-	-
FBP-140	+	+	+
FBP-417	+	-	-
BNP-115	+	-	-
BP-180	+	-	-
BP-509	+	-	-

Du: Dosagem de uso

x: Fator de aumento da concentração D_u

(+) Presença de crescimento microbiano

(-) Ausência de crescimento microbiano

De acordo com os resultados obtidos a $35\pm 2^\circ\text{C}$, houve uma discrepância entre os valores de erradicação obtidos para o biocida FBP-140, cuja ação bacteriostática é mais proeminente que os demais. Neste caso, pode-se atribuir a este resultado que a adaptação dos microrganismos em temperatura superior à normalmente encontrada em seu habitat pode afetar o desenvolvimento de determinadas cepas. Portanto, quando os ensaios foram realizados em temperatura ideal para a microbiota da amostra estudada, embora não tenha ocorrido diferença na adesão celular quantitativa e qualitativa, o grau de fragilidade das células pode ter decaído em relação ao outro biofilme formado e somente o biocida com caráter bacteriostático mais ressaltado pôde diferenciar a robustez das células submetidas em ambas temperaturas.

Assim, é verificado que a manutenção das características mais próximas do meio a que os microrganismos se encontram naturalmente é ideal para que os resultados obtidos em laboratório sejam mais condizentes com a realidade industrial. Porém, na maioria dos resultados obtidos comparando-se as duas temperaturas de incubação, não houve diferença significativa na erradicação dos biofilmes com os biocidas utilizados.

4.9- Comparação da susceptibilidade de células planctônicas e sésseis aos biocidas

A fim de equipararmos as concentrações de MMC e MBEC, foi considerada a temperatura de incubação de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, já que ambos os testes foram efetuados nesta condição.

As concentrações mínimas de biocida para a erradicação das células em biofilme foram, conforme sumarizado na Tabela 21, de 16 a 257 vezes maiores que as requeridas para as células planctônicas. Tal variação está de acordo com o previsto pela literatura, que pode chegar a até 1.000 vezes, devido a diferenças fisiológicas e estruturais entre ambas as formas de vida dos microrganismos, fatores importantes que interferem na atuação de agentes antimicrobianos (Costerton *et al.*, 1987).

Tabela 21: Resultados comparativos entre o desempenho dos biocidas testados no biofilme formado a partir do inóculo 1.

Biocida	MMC (% v/v)	MBEC (% v/v)
FBP-124	0,056	1,8
FBP-128	0,075	1,2
FBP-140	0,028	1,8
FBP-417	0,093	6,0
BNP-115	0,014	3,6
BP-180	0,045	1,4
BP-509	0,075	2,4

O biocida que menos necessitou de ativos para eliminar as células planctônicas (BNP-115) não foi o mesmo para a eliminação do biofilme formado a partir da mesma amostra (FBP-128). Provavelmente isto se deve ao fato de que as cepas planctônicas foram selecionadas pela capacidade de adesão durante a formação do biofilme, assim sendo, houve uma diferença na microbiota presente na emulsão e no biofilme formado. Deste modo, a atuação do biocida pode ter sido diferenciada nestes dois meios. Outro aspecto que pode interferir na diferença de atuação do biocida é a sua capacidade de penetração no

biofilme (maior quanto menor a massa molar), e de atravessar a membrana celular (maior quanto maior o coeficiente de partição).

O FBP-128 apresentou a menor diferença entre os valores de concentração para MMC e MBEC, mas a ação global dos biocidas pode ser considerada como similar em células do tipo Gram-negativas. A concentração para a erradicação do biofilme foi 12 vezes superior à concentração de uso, para todos os biocidas. Em função disto, o custo para o tratamento de biofilmes é altamente onerado em relação ao normalmente gasto para a manutenção do sistema, situação esta que pode ser evitada quando ensaios laboratoriais de erradicação são devidamente empregados.

4.10- Discussão global dos resultados obtidos para a adequação da metodologia proposta

Para sumarizar os resultados que foram alcançados neste estudo, são mostrados primeiramente os parâmetros testados e seus efeitos, para a adequação da metodologia de formação e erradicação de biofilmes mistos para aplicação industrial.

Quando o valor das variáveis inerentes ao método é alterado, pode ou não haver interferência significativa nos resultados do ensaio. Temos na Tabela 22 a relação entre as mesmas e as etapas principais referentes à metodologia proposta para o estudo de biofilmes com fluido de corte.

Tabela 22: Efeito das variáveis envolvidas nas etapas de ensaio para a formação e erradicação de biofilmes a partir de fluido de corte.

Variáveis alteradas	Efeito nas etapas do ensaio	
	Quantidade de células aderidas	Concentração de biocida para erradicação do biofilme
Redução da temperatura	Não afeta	Variável
Aumento do tempo de incubação	Aumenta	Não avaliado
Aumento do tempo de sonicação	Variável	Não avaliado
Redução da concentração do inóculo	Não afeta	Aumenta

Conforme verificado anteriormente, com a elevação da temperatura ocorre um desvio da condição natural da amostra, fazendo com que a erradicação seja mais facilitada.

Um maior tempo de incubação, até um determinado período, proporcionou aumento do número de células aderidas. Esta variação em relação ao teste de erradicação não foi verificada pois o tempo foi fixado.

A duração do procedimento de sonicação afetou a viabilidade celular e assim, pôde interferir negativamente na enumeração das células aderidas aos corpos de prova. Em hipótese, o mesmo pode ser válido quando este procedimento é realizado para a contagem das células viáveis após o contato com os biocidas, podendo haver um falso resultado positivo de erradicação.

Quando uma mesma amostra é utilizada tal como é encontrada em seu próprio ambiente e quando é diluída, observou-se similaridade na adesão celular (quantitativa e qualitativa), porém a erradicação da amostra diluída se mostrou mais difícil, pois a microbiota ali presente foi modificada podendo ocorrer alterações comportamentais atípicas.

O biocida que apresentou melhor desempenho na erradicação das células planctônicas (BNP-115) foi o que causou menor efeito na erradicação do biofilme quando o inóculo foi diluído. O biocida com menor desempenho na erradicação das células planctônicas (FBP-128) apresentou o melhor resultado para erradicar os biofilmes formados com o inóculo concentrado nas temperaturas de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ e de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, e também com o inóculo diluído. Para o inóculo diluído há uma inversão do desempenho dos biocidas quando comparado aos resultados obtidos para a erradicação das células planctônicas presentes no inóculo concentrado.

Assim, observa-se que não há relação direta entre o efeito do biocida para erradicar as células planctônicas e para erradicar o biofilme formado a partir da emulsão contaminada por diversos microrganismos, já que as células constituintes neste biofilme podem não ser as mesmas encontradas na forma livre.

Nos ensaios para a determinação da MBEC com a alteração das condições de ensaio não houve mudança do biocida com maior eficiência, mas observa-se diferença no biocida com menor desempenho apresentado. Quando se utilizou o inóculo 1 concentrado, incubado a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, o biocida menos efetivo foi o mesmo com menor atividade para a preservação da emulsão.

Para a preservação e manutenção do grau de contaminação na emulsão, o biocida mais eficiente foi o BP-180, cuja atividade nos demais ensaios de erradicação foi intermediária.

Portanto, para cada situação um dado princípio ativo ou conjunto de ativos se mostra mais eficiente que outro, e esta análise é de suma importância para a determinação do tratamento que menos cause danos e prejuízos ao setor industrial e ao meio ambiente.

Este estudo forneceu informações inovadoras, pois atualmente, são utilizadas como parâmetro extrapolações de dados obtidos na área médica e odontológica, mais profundamente enfatizadas e estudadas devido principalmente à importância preventiva e corretiva ser mais facilmente aceita. Além disto, os biofilmes estudados nestas áreas do conhecimento são normalmente formados por uma única espécie (monoespécie), que são eventualmente encontrados em ambientes naturais e industriais em comparação aos constituídos por multiespécies (Jefferson, 2004). Portanto, a adaptação da metodologia MBEC™ auxiliou na definição de biocidas e de sua dosagem, baseada em condições próximas e representativas da realidade nas indústrias.

Parte destes resultados será publicada nos anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2006.

5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1- Conclusões

Com relação à avaliação do efeito de diferentes diluentes na recuperação celular de amostras industriais contaminadas, a água destilada pôde ser usada como diluente padrão sem comprometimento do resultado final e com baixo custo de preparo, proporcionando a melhor relação custo/benefício dentre os diluentes testados.

Dentre os microrganismos presentes no fluido de corte amostrado verificou-se a presença de cepas capazes de degradar as cadeias de hidrocarboneto componentes do fluido de corte, facilitando a desestabilização desta emulsão (óleo/água). O controle dos contaminantes planctônicos é, portanto, essencial para prevenir problemas futuros relacionados a biofilmes e comprometimento das propriedades físico-químicas do fluido de corte.

Foi constatado que o dispositivo MBEC™ pôde ser utilizado para ensaios com amostras contaminadas por culturas mistas, com as devidas adaptações, tais como a padronização do inóculo e a determinação do tempo de formação para a obtenção de células aderidas requerida para ensaios de susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Outros parâmetros inerentes à amostra também são de suma importância, como a temperatura de incubação. Após a determinação das etapas de adaptação da metodologia para aplicação industrial, os ensaios relativos ao uso do dispositivo MBEC™ se mostraram simples (pouco preparo de materiais), práticos (mínimo manuseio) e rápidos (resultados em 4 dias).

Dentre as dificuldades em utilizar amostras ambientais como matriz para a obtenção de biofilmes de acordo com a microbiologia tradicional, verificou-se que as cepas isoladas da amostra contaminada não possuíam grande capacidade de adesão ao suporte quando retiradas do meio ao qual estavam adaptadas, indicando que a técnica de isolar e testar culturas puras não permite o estudo de sistemas microbianos complexos. Assim, a interação e proporcionalidade entre espécies podem ser fatores que governam a formação de biofilmes. Outra consequência do uso das cepas isoladas foi a ocorrência de alguns microrganismos que não puderam ser cultivados de forma prolongada em laboratório.

A concentração inibitória mínima e de erradicação para as células planctônicas foi inferior à dosagem recomendada para todos os biocidas testados, podendo-se considerar o exposto como um caso típico de contaminação, sem a presença de microrganismos resistentes ao tratamento convencional. Estes resultados mostraram que a presença de biofilmes (verificada na indústria sob estudo) nem sempre pode ser vinculada à resistência microbiana das células de origem. Contudo, a presença de biofilmes é prejudicial, pois estes consistem em estruturas de natureza mais difícil para erradicação.

Foi verificado que a concentração de biocida requerida para a erradicação do biofilme formado a partir de fluido de corte pode ser 12 vezes superior à concentração normalmente aplicada e de 16 a 257 vezes a concentração de erradicação para células livres.

Finalmente, os resultados deste estudo contribuíram para determinar como proceder em ensaios laboratoriais para monitoramento (preventivo e corretivo de biofilmes) com a utilização de amostras contaminadas por culturas mistas. Com tais parâmetros podem ser definidas futuras intervenções para o redimensionamento dos rejeitos de fluido de corte contaminado, que geralmente são causa de prejuízos. Com isto, a preservação ambiental é também beneficiada, com a minimização do descarte da emulsão e os impactos relacionados a este procedimento.

5.2- Sugestões

Visto que o foco deste estudo foi estreitar os parâmetros laboratoriais para atender à necessidade industrial e que, para tanto, resultados de erradicação satisfazem, à princípio, este objetivo, informações mais específicas podem ainda ser determinadas.

Para trabalhos futuros, a sugestão é melhor elucidar os dados obtidos, a fim de se determinar qual é o grau de interferência das variáveis de ensaio na adesão celular qualitativa (identificação dos microrganismos) e sua relação com o desempenho dos biocidas testados. Um ponto que pode ser explorado é a averiguação da população microbiana presente na amostra após diluição, para a inserção de informações ao já exposto, em hipótese, sobre a diferença comportamental observada em relação à sua maior resistência à erradicação.

Outra perspectiva é a verificação da formação de biofilmes utilizando cultura mista composta por bactérias Gram-positivas e a interação entre microrganismos Gram-negativos e positivos como inóculos para a formação de biofilmes. Também seria de grande valia a realização de experimentos direcionados à adesão de fungos (bolores e leveduras), freqüentes causadores de biofilmes em usinas.

Por fim, pode-se também mencionar o ajuste dos resultados experimentais para outros segmentos industriais, além de abranger ensaios simultaneamente em campo, a fim de consolidar e aproximar as informações obtidas entre o laboratório e a indústria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison, D. G.; Gilbert, P.; Lappin-Scott, H. M.; Wilson, M.; 2000. Fifty-ninth symposium of the society for general microbiology held. University of Exeter. 1-23.
- Allsopp, D.; Seal, K. J.; 1986. Biodeterioration of refined and process materials. In: Introduction to biodeterioration. Editora Edward Arnold. Capítulo 3, 30-41.
- Almeida, M. A. N.; Sérvulo, E. F. C.; França, F. P.; 2002. Monitoramento da formação de biofilme em torre de refrigeração. 6ª Conferência sobre Tecnologia de Equipamentos - COTEQ. Salvador-BA, 7 páginas.
- Arcuri, E. F.; 2000. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. Revista Leite e Derivados. 53, v. 9, 40-45.
- Bardouniotis, E.; Huddleston, W.; Ceri, H.; Olson, M. E.; 2001. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC™ assay system. FEMS Microbiology Letters, 203, 263-267.
- Burk, J.M.; 1984. Slime control seminar. Buckman Laboratories International Inc., Campinas-SP, Brasil.
- Capelletti, R.V.; Moraes, A.M.; Eguchi, S.Y.; Lucchesi, E.G.; 2005. Efeito do diluente na recuperação de microrganismos em amostras industriais. In: Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Sinaferm, em CD. Recife-PE, Brasil, 7 páginas.
- Carturan, G. F.; 1999. Teste de eficácia de conservantes ou teste de desafio. In: Guia ABC de Microbiologia: controle microbiológico na indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Associação Brasileira de Cosmetologia, 2ª ed., Capítulo 6, 65-68.

CAS (Chemical Abstracts Service). Disponível em <<http://www.hazard.com/msds/index.php>>. Acesso em 13 de abril de 2006.

Ceri, H.; Olson, M.E.; Stremick, C.; Read, R.R.; Morck, D.; Buret, A.; 1999. The Calgary Biofilm Device: A new technology for the rapid determination of antibiotic susceptibility of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (6), 1771-1776.

Ceri, H.; Morck, D.W.; Olson, M.E.; 2001. Biocide susceptibility testing of biofilms. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Block, Seymour S. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 5^a ed., Capítulo 75, 1429-1437.

Christensen, B. E.; Characklis, W. G.; 1990. Physical and chemical properties of biofilms. In: *Biofilms*. Characklis, W.G., Marshall, K.C. Editora John Wiley and sons, Inc, 93-130.

Costerton, J. W.; Geesey, G. G.; Cheng, K. J.; 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86-95.

Costerton, J. W.; Cheng, K. J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. J.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M., Marrie, T.; 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 435-464.

Dankert, J.; Hogt, A. H.; Feijen, J.; 1986. Biomedical polymers: Bacterial adhesion, colonization and infection. *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 2, 219-301.

Davies, D. G.; Parsek, M. R.; Pearson, J. P.; Iglewski, B. H.; Costerton, J. W.; Greenberg, E. P.; 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280, 295-298.

Denyer, S. P.; Stewart, G. S. A. B.; 1998. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 261-268.

- Dirckx, P.; Davies, D.; 2005. Disponível em <http://www.genomenewsnetwork.org/articles/06_02/biofilms_image1.shtml>. Acesso em 13 de abril de 2006.
- European Commission, 1998. Biocidal Products Directive 98/8/EC. Disponível em <http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/evaluation/borderline_en.htm>. Acesso em 14 de setembro de 2005.
- Farmacopéia Brasileira, 1988. Métodos Biológicos, Cap. V, 4ª. edição, Atheneu Editora, São Paulo.
- Flint, S. H.; Bremer, P. J.; Brooks, J. D.; 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant description. *Biofouling*, 11, 81-97.
- Frank, J. H.; Kofi, R.; 1990. A surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*. v. 53, nº 7, 550-554.
- Hall, H.E.; 1970. Effects of diluents on the recovery of microorganisms from foods. *Journal Milk Food Technology*. 33, 311-313.
- Heinzel, M.; 1998. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 225-234.
- Hobson, D.W.; Bolsen, K.; 2001. Methods of the testing oral and topical antiseptics and antimicrobials. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Block, Seymour S., Editora Lippincott Williams & Wilkins, 5ª ed., Capítulo 69, 1329-1359.
- Hughes, K. A.; Sutherland, I. W.; Martin, V. J.; 1998. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 144, 3039-3047.
- IPEL Itibanyl Produtos Especiais Ltda. Boletins e relatórios técnicos, 2006.

- Jahn, A.; Griebe, T.; Nielsen, P. H.; 1999. Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling*, 14 (1), 49-57.
- Jefferson, K. K.; 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163-173.
- Johnsrud, S. C.; 1997. Biotechnology for solving slime problems in the pulp and paper industry. In: Scheper, T. ed. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry – Advances in Biochemical Engineering Biotechnology.*, 311-328.
- Leahy, J. G.; Colwell, R. R.; 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Rev.*, 54, 305-315.
- LeChevallier, M. W.; 1990. Biocides and the current status of biofouling control in water systems. In: Flemming, H-C, Geesey, G.G. eds. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Heidelberg, Springer-Verlag, 113-132.
- Lewis, K.; 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45, 999-1007.
- Lima, U. A.; 1975. Microbiologia do petróleo. In: *Biotecnologia – Tópicos de microbiologia industrial*. Editora Edgard Blucher Ltda, Volume 2, Capítulo 8, 169-173.
- Ludensky, M.; 2003. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. 2003. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 255-263.
- Lutey, R. W.; 1995. Process cooling water. In: *Handbook of Biocide and Preservative Use*. Rossmore, H.W. Editora Blackic Academic & Professional, 51-82.
- Mah, T.-F., C.; O'Toole, G. A.; 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology*, v.9, nº1, 34-39.

- Mattila-Sandholm, T.; Wirtanen, G.; 1992. Biofilm formation in the industry: a review. *Food Reviews International*, 8 (4), 573-603.
- Marques, L.L.R.; Olson, M.E.; Manfio, G.P.; 2004. Notas de aula do Workshop em biofilmes microbianos. CPQBA, Unicamp.
- MBEC Bioproducts Incorporation, Canadá. Disponível em <<http://www.mbec.ca/productsnew.html>>. Acesso em 25 de janeiro de 2005.
- Maturin, L.J.; Peeler, J.T.; 2001. Bacteriological Analytical Manual. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>>. Acesso em 22 de março de 2005.
- Messer, J.W.; Midura, T.F.; Peeler, J.T.; 1992. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. Editora American Public Health Association, 3^a ed., Capítulo 2, 26-27.
- Mian, M.A.; Fleet, G.H.; Hocking, A.D.; 1997. Effect of diluent type on viability of yeasts enumerated from foods or pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 35, 103-107.
- Milacron Marketing Co., 1999. Randicity control of water-based metalworking fluids. Technical Report J/N 96/95, 1-3.
- Morck, D. W.; Olson, M. E.; Ceri, H.; 2001. Microbial Biofilms: preservation, control and removal. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Block, Seymour S. Editora Lippincott Williams & Wilkins, 5^a ed., Capítulo 34, 675-681.
- Morton, L.H.G.; 1987. Detection of significant spoilage organisms in soluble oil-in-water metal-working fluids. In: *Industrial Microbiological Testing*. Hopton, J. W.; Hill, E. C. Editora Blackwell Scientific Publications, Technical Series, 23, Boston, 221-225.

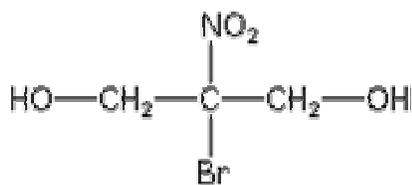
- Mosteller, T. M.; Bishop, J. R.; 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection*. v. 56, nº 1, 34-41.
- Oblinger, J.L.; Kennedy, J.E.; 1976. Evaluation of diluents used for total counts. *Journal Milk Food Technology*, 39, 114-116.
- O'Toole, G.A.; Kolter, R.; 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* 28, 449-461.
- Olson, M.E.; Ceri, H.; Morck, D.W.; Buret, A.G.; Read, R.R.; 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66 (2), 86-92.
- Pásteran, F., Corso, A., Galas, M.; 2003. Sensibilidad a los antimicrobianos. In: Manual de procedimientos, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires, Argentina, Capítulo II.1, Parte II, 9-11.
- Pharneuropa, 2003. Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests. In: *European Pharmacopoeia*, 15.3, Capítulo 2.6.12.
- Pintado, J. L.; Montero, F.; 1986. Corrosión Microbiológica em Centrais Hidroelétricas. *Revista Iberoamericana Corrosion y Protection*, 17, 361-366.
- Pujo, M. D.; Bott, T. R.; 1992. Biocide efficacy on biofilm growth. In: *Biofilms – Science and Technology*. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. Kluwer Academic Publishers, 583-588.
- Rohm & Haas Company. Disponível em <<http://www.rohmhaas.com.html>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2005.
- Runge, P., Duarte, G. 1989. *Lubrificantes nas Indústrias*. Editora Triboconcept. 313 páginas.

- Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N.F.A.; 2001a. Preparação de amostras de alimentos sólidos ou líquidos. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Edições Loyola Ltda., 2^a ed., 14-20.
- Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N.F.A.; 2001b. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrótrófilos e bolores e leveduras em placas. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Edições Loyola Ltda., 2^a ed., 21-29.
- Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N.F.A.; 2001c. Contagem de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Edições Loyola Ltda., 2^a ed., 31-39.
- Stoodley, P.; Wilson, S.; Hall-Stoodley, L.; Boyle, J. D.; Lappin-Scott, H. M.; Costerton, J. W.; 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, nº 12, v. 67, 5608-5613.
- Straka, R.P., Stokes, J.L.; 1957. Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. *Applied. Microbiology*, 5, 21-25.
- Streit, W. R.; Daniel, R.; Jaeger, K. E.; 2004. Prospecting for biocatalysis and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 285-290.
- Veillette, M.; Thorne, P. S.; Gordon, T.; Duchaine, C.; 2004. Six month tracking of microbial growth in a metalworking fluid after system cleaning and recharging. *Annals of Occupational Hygiene*, 48(6), 541-546.
- Vieira, M. J.; 1995. Estudo da formação de filmes biológicos por *Pseudomonas fluorescens* e dos efeitos associados à transferência de massa interna e à incorporação de partículas de caulino. Universidade do Minho, Braga, Portugal. Tese de doutorado.

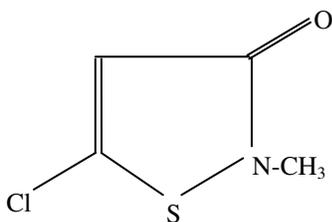
- Walker, J. T.; Hanson, K.; Caldwell, D.; Keevil, C. W.; 1998. Scanning confocal laser microscopy study of biofilm induced corrosion on copper plumbing tubes. *Biofouling*, 12, 333-344.
- Wills, A. J.; Bott, T. R.; 1997. Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* biofilm development by hydrogen peroxide. In: Understanding heat exchanger fouling and its mitigation. Ciocco Conference Center, Itália.
- Wimpenney, J. W. T.; Peters, A.; Scourfield, M. A.; 1993. The physiology and biochemistry of biofilm. In: Structure and Function of Biofilms. Characklis, W.G., Wilderer, P.A. John Wiley and sons, Inc, 111-127.
- Zobell, C. E.; 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46, 39-56.

ANEXOS

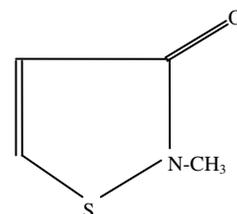
A.1 - Fórmulas estruturais dos princípios ativos dos biocidas.



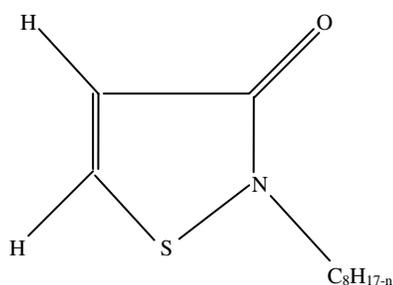
Bronopol



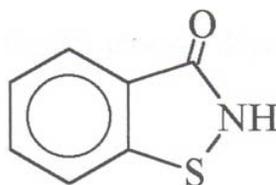
Clorometilisotiazolinona



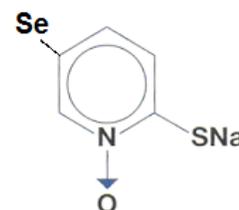
Metilisotiazolinona



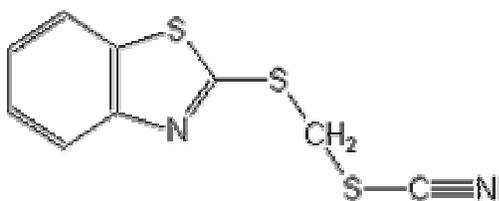
N-octilisotiazolinona



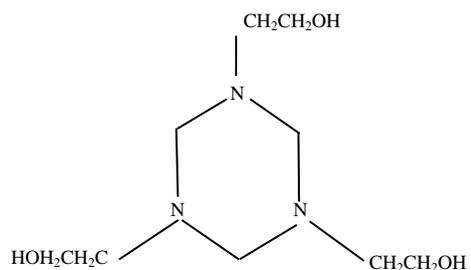
Benzoisotiazolinona



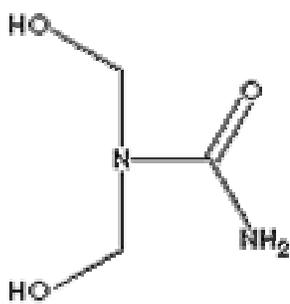
Piritionato de sódio



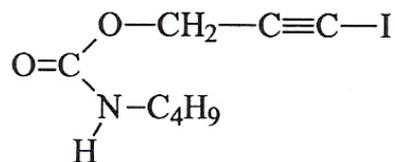
Tiocianometiltiobenzotiazol



Triazina



Dimetiluréia



Iodopropinilbutilcarbamato

A.2 - Formulação dos meios de cultura

A.2.1 - Tryptic Soy Agar (TSA), Difco.

Digerido pancreático de caseína.....	15 g
Digerido enzimático de soja.....	5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Àgar.....	15 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

A.2.2 - Eosin Methylen Blue Agar (EMB), Difco.

Peptona.....	10 g
Lactose.....	10 g
Fosfato de potássio dibásico.....	2 g
Eosina Y.....	0,4 g
Azul de metileno.....	0,065 g
Àgar.....	15 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

A.2.3 - Fluid Thioglycollate Medium (FTM), Difco.

Digerido pancreático de caseína.....	15 g
Extrato de levedura.....	5 g
Dextrose.....	5,5 g
Cloreto de sódio.....	2,5 g
L-cistina.....	0,5 g
Tioglicolato de sódio.....	0,5 g
Resazurina.....	0,001 g
Àgar.....	0,75 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

A.2.4 - Postgate Medium B, formulado.

Fosfato de Potássio monobásico	0,5 g
Cloreto de amônia	1 g
Sulfato de sódio.....	0,1 g
Cloreto de magnésio.....	1,6 g
Extrato de levedura.....	1 g
Sulfato de ferro.....	0.0004 g
Piruvato de sódio	3,5 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

A.2.5 - Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Difco.

Concentrado enzimático de caseína.....	10 g
Dextrose.....	40 g
Ágar.....	15 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

A.2.6 - Tryptic Soy Broth (TSB), Difco.

Digerido pancreático de caseína.....	17 g
Digerido enzimático de soja.....	3 g
Dextrose.....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Fosfato dipotássico.....	2,5 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

A.2.7 - Minimal Medium Davis suplementado com óleo mineral (MMO), formulado.

Fosfato de potássio bibásico.....	7 g
Fosfato de potássio monobásico	5 g
Citrato de sódio.....	5 g
Sulfato de magnésio.....	0,1 g
Sulfato de amônio.....	1 g
Óleo de corte mineral.....	50 mL
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

A.3 - Escala de McFarland

Escala de McFarland e estimativa da correspondência com concentrações de células microbianas do tipo Gram-negativas (adaptada de Pastéran *et al.*, 2003).

Escala de McFarland	Número de bactérias (x10⁸ UFC/mL)
0,5	1,5
1	3
2	6
3	9
4	12
5	15
6	18
7	21
8	24
9	27
10	30

Para a obtenção de suspensões com concentrações celulares superiores à da escala de McFarland, é necessária a comprovação da quantidade de células por plaqueamento em meio de cultura específico para bactérias e posterior contagem das UFC/mL (procedimento descrito no item 3.2.1).