



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**“INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MATERIAIS NA FORMAÇÃO E
SUSCEPTIBILIDADE DE BIOFILMES A AGENTES ANTIMICROBIANOS”**

Autora: ME Eliane Gama Lucchesi

Orientadora: Prof^a. Dra. Ângela Maria Moraes

Co-orientadora: Dr^a. Silvia Yuko Eguchi

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Janeiro de 2012

Campinas, São Paulo

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

Lucchesi, Eliane Gama
L962i Influência de diferentes materiais na formação e
susceptibilidade de biofilmes a agentes antimicrobianos /
Eliane Gama Lucchesi. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Angela Maria Moraes, Silvia Yuko Eguchi.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia Química.

1. Biofilmes. 2. Antimicrobianos. 3. Susceptibilidade. 4.
Superfícies. I. Moraes, Angela Maria. II. Eguchi, Silvia
Yuko. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Influence of different materials in the formation of biofilms and
susceptibility to antimicrobial agents

Palavras-chave em Inglês: Biofilms, Antimicrobial, Susceptibility, Surfaces

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Alexandre Hamilton Pereira Ferreira, Aline Carvalho da Costa,
Maria da Graça Stupiello Andrietta, Rose Marry Araújo Godim
Tomáz

Data da defesa: 29-11-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

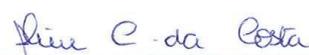
Tese de doutorado defendida por Eliane Gama Lucchesi e aprovada em 29 de novembro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Angela Maria Moraes – Orientadora



Dr. Alexandre Hamilton Pereira Ferreira



Profa Dra. Aline Carvalho da Costa

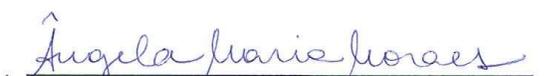


Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta



Dra. Rose Marry Araújo Gondim Tomáz

Este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado defendida pela aluna Eliane Gama Lucchesi, orientada pela Profa. Dra. Ângela Maria Moraes e co-orientada pela Dra. Sílvia Yuko Eguchi


Profa. Dra. Ângela Maria Moraes – Orientadora


Dra. Sílvia Yuko Eguchi

“Um dia o Homem quis ser Rei. O rei quis ser DEUS, porém só DEUS quis ser homem.”

Autor Desconhecido

*A minha mãe Emilia
(sempre em nossos corações),
por todo seu amor, apoio,
segurança e sabedoria, sem
os quais eu não teria
conseguido chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a dádiva de viver.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe, Emilia (sempre em nossos corações), meu pai Antonio, minha irmã Bety, meu cunhado Nando, meu sobrinho, Guilherme, e ao meu marido Nelsinho, pelo amor, carinho, paciência e principalmente, por não terem me deixado desistir nas horas mais difíceis.

A minha orientadora Prof^a Dra. Ângela Maria Moraes e co-orientadora Dra. Sílvia Yuko Eguchi, pela oportunidade, paciência, ensinamento e apoio recebido durante este tempo.

Ao Sr. Walter Piccirillo Pinto, Diretor Presidente da IPEL - Itibanyl Produtos Especiais Ltda., por incentivar o meu crescimento profissional, e por permitir e financiar a realização do presente trabalho.

Ao Giovanni Caritá Junior, pelo companheirismo, apoio e amizade. Ao Sr. Walter Oliveira, pelas orientações e sugestões.

Ao corpo técnico do Laboratório de Microbiologia da IPEL, Anderson, Daniel, Francisco, Marcelo, Rose e Telma, pela ajuda, compreensão, carinho e amizade recebidos de todos.

À Faculdade de Engenharia Química – Departamento de Processos Tecnológicos pela oportunidade concedida.

A todas as empresas parceiras que colaboraram para o andamento deste estudo.

Aos Professores Aparecido R. Coutinho do Laboratório de energia e meio ambiente (LEMA – UNIMEP), Wellington Araujo da Universidade de Mogi das Cruzes, ao Engenheiro Luis Carlos Bevilaqua da empresa Mast Comercial e Importadora Ltda. pelo auxílio na realização de ensaios e na interpretação dos resultados.

A Adriane Cristine Sarti Sprogis do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de biologia (Unicamp) e Kelly Roberta de Palma do LRAC – Faculdade de Engenharia Química (Unicamp) pela ajuda nos ensaios de caracterização das partículas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABAL: Associação Brasileira de Alumínio

ABIVIDRO: Associação Técnica Brasileira das Indústrias Automáticas de Vidro

AI: auto indutores

AISI: American Iron and Steel Institute

ALH: Homosserinas lactonas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM: American Society for Testing and Materials

BET: Modelo matemático para determinação de área superficial, volume de poros, tamanho de poros

BJH: Modelo matemático para determinação de área superficial, volume de poros, tamanho de poros

BPF: Boas Práticas de Fabricação

BPF e C: Boas Práticas de fabricação e Controle

CCA: Análise de correspondência canônica

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CMEB: concentração mínima de erradicação do biofilme

DCA: Análise de correlação

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DH: Modelo matemático para determinação de área superficial, volume de poros, tamanho de poros

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMB: Eosina azul de metileno Agar (meio de cultivo)

EPS: Extracellular Polymeric Substance

EPA: Environmental Protection Agency

FTM: Tioglicolato Fluido (meio de cultivo)

LEMA: Laboratório de energia e meio ambiente (Universidade Metodista de Piracicaba)

MAPA: Ministério da Agricultura e do Abastecimento

MBEC: Minimal Biofilm Erradication Concentration

MEA: monoetanolamina

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

mL: mililitro

MS: Ministério da Saúde

PCA: Análise de componentes principais

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase).

PVC: policloreto de vinila (polímero)

PVDF: difluoreto de poli vinilideno (polímero)

QS: Quorum-sensing

RDA: Análise de redundância

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RNA: Ácido Ribonucléico

SAE: Society of automotive engineers

SDA: Sabouraud Dextrose Agar (meio de cultivo)

SVS: Secretaria de Vigilância Sanitária

TSA: Triptona e Soja Agar (meio de cultivo)

TSB: Triptona e Soja Líquido (meio de cultivo)

TP: Teste padrão

UB: Unidade de brilho

UFC: Unidade formadora de colônia

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVO.....	7
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3.1. Materiais comumente empregados no setor industrial.....	13
3.1.1. Vidro.....	13
3.1.2. Metais.....	14
3.1.2.1. Aço carbono.....	16
3.1.2.2. Aço inoxidável.....	17
3.1.3. Polímeros.....	18
3.1.3.1. Cloreto de polivinila (PVC).....	19
3.1.4. Alumínio.....	21
3.2. Corrosão e biocorrosão de materiais.....	21
3.2.1. Corrosão de Metais.....	22
3.2.2. Biocorrosão de metais.....	24
3.3. Biofilmes.....	27
3.3.1. Definição de biofilmes.....	27
3.3.2. Histórico do estudo de biofilmes.....	28
3.3.3. Formação dos biofilmes.....	32
3.3.4. Controle do biofilme em instalações industriais.....	39
3.3.5. Susceptibilidade de biofilmes e células planctônicas a biocidas.....	43
3.4. Quorum Sensing.....	44

3.4.1. Definição de Quorum Sensing.....	44
3.4.2. Histórico do estudo de Quorum Sensing.....	46
3.5. Contaminação microbiológica em fluido de corte.....	49
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	52
4.1. Material.....	52
4.2. Métodos.....	55
4.2.1. Levantamento de dados sobre a distribuição numérica dos tipos materiais usados em plantas industriais.....	55
4.2.2. Caracterização das superfícies.....	56
4.2.3. Análise da população microbiana do fluido de corte contaminado	57
4.2.4. Formação dos biofilmes na superfície de partículas de diferentes materiais.....	58
4.2.5. Estudo da adesão microbiana nas diferentes superfícies por microscopia eletrônica de varredura.....	60
4.2.6. Estudo da população microbiana dos biofilmes por eletroforese em gel de gradiente desnaturante.....	60
4.2.6.1. Análise por meio da técnica de PCR-DGGE.....	61
4.2.6.2. Análise estatística.....	62
4.2.7. Determinação da concentração mínima de biocida para a erradicação dos biofilmes formados nos diferentes materiais.....	63
4.2.8. Determinação da concentração residual mínima de biocida para retardar ou impedir a formação do biofilme em lâminas de diferentes materiais.....	64
4.2.9. Determinação da concentração de choque necessária para erradicar o biofilme formado na superfície dos corpos de prova.....	67
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	68
5.1. Levantamento de dados sobre a distribuição de tipos materiais usados em plantas industriais e procedimentos operacionais.....	68
5.2. Caracterização das superfícies utilizadas.....	72

5.3. Análise da população microbiana do fluido de corte contaminado.....	86
5.4. Formação dos biofilmes na superfície de partículas de diferentes materiais	87
5.5. Estudo da adesão microbiana nas diferentes superfícies por microscopia eletrônica de varredura.....	93
5.6. Estudo da população microbiana dos biofilmes por DGGE - eletroforese em gel de gradiente desnaturante.....	101
5.7. Determinação da concentração mínima de biocida para a erradicação dos biofilmes formados nos diferentes materiais.....	104
5.8. Determinação da concentração residual mínima de biocida para retardar ou impedir a formação do biofilme em lâminas de diferentes materiais.....	112
5.9. Determinação da concentração de choque necessária para erradicar o biofilme formado na superfície dos corpos de prova.....	117
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	120
6.1. Conclusões.....	120
6,2. Sugestões.....	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
Apêndice 1 – Meios de Cultura.....	137
Apêndice 2 – Questionário.....	139
Apêndice 3 – Reagentes para microscopia eletrônica de varredura.....	140
Apêndice 4 – Tabelas referentes aos gráficos.....	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Técnicas de fabricação de metais	15
Figura 2: Classificação das ligas ferrosas.....	16
Figura 3: Estrutura geral de um PVC.....	20
Figura 4: Estrutura do Biofilme.....	31

Figura 5: Etapas da formação do biofilme.....	36
Figura 6: Estrutura geral da homoserina lactona.....	45
Figura 7: Dispositivo para formação de biofilmes em lâminas.....	65
Figura 8: Distribuição dos materiais nos sete segmentos industriais pesquisados.....	69
Figura 9: Nível de conhecimento dos pontos críticos da área fabril, nos 7 segmentos industriais pesquisado no questionário.....	70
Figura 10: Cronograma e procedimento de limpeza mecânica e sanitização industrial.....	72
Figura 11: Morfologia da superfície das partículas de vidro analisadas em MEV em aumentos de 100 e 200 vezes.....	78
Figura 12: Morfologia da superfície das partículas de alumínio analisadas em MEV em aumentos de 100 e 200 vezes.....	79
Figura 13: Morfologia da superfície das partículas de aço carbono analisadas em MEV em aumentos de 100 e 200 vezes.....	80
Figura 14: Morfologia da superfície das partículas de PVC analisadas em MEV em aumentos de 100 e 200 vezes.....	81
Figura 15: Morfologia da superfície das partículas de aço inoxidável analisadas em MEV em aumentos de 100 e 200 vezes.....	82
Figura 16: Curva de crescimento dos biofilmes nas cinco superfícies testadas.....	88
Figura 17: Curva de crescimento dos biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas superfícies dos cinco materiais testados.....	90
Figura 18: Curva de crescimento dos biofilmes resultantes do óleo de corte contaminado com acréscimo de meio de cultivo fresco após 48 horas de incubação.....	92

Figura 19: Análise por MEV de biofilmes em partículas de alumínio, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3)6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h....	95
Figura 20: Análise por MEV de biofilmes em partículas de aço carbono, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3)6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h.....	97
Figura 21: Análise por MEV de biofilmes em partículas de aço inoxidável, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3)6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h.....	98
Figura 22: Análise por MEV de biofilmes em partículas de PVC, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3)6 h; 4) 24 h e; 5) 48.h....	99
Figura 23: Análise por MEV de biofilmes em partículas de vidro, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3)6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h....	100
Figura 24: Perfis de DGGE para a comunidade bacteriana dos biofilmes formados nas partículas de diferentes materiais (vidro, PVC, aço inoxidável, aço carbono e alumínio), nos tempos de incubação de 10 minutos, 1 h, 6 h, 24 h e 48 h.....	102
Figura 25: Análise de Componentes Principais (PCA) entre o perfil de bandas de DGGE de bactérias e fatores ambientais (material e tempo de incubação). Os valores nos eixos indicam porcentagem da variância correlacionada entre os tratamentos nos respectivos eixos.....	103
Figura 26: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de vidro.....	105
Figura 27: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de aço carbono.....	106

Figura 28: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de aço inoxidável.....	106
Figura 29: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de PVC.....	107
Figura 30: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de alumínio.....	107
Figura 31: Susceptibilidade dos biofilmes formados na superfície dos materiais aos microbicidas com 10 vezes a concentração indicada pelo fabricante em termos da variação da concentração celular por massa do material (a) e por área superficial (b).....	111
Figura 32: Resultados da recuperação microbiana dos biofilmes formados na superfície das lâminas de aço carbono, aço inoxidável, alumínio, PVC e vidro.....	113
Figura 33: Resultados da recuperação microbiana dos biofilmes e do residual de triazina no sistema com 0,1% de microbicida.....	115
Figura 34: Resultados da recuperação microbiana dos biofilmes e do residual de triazina no sistema com 0,2% de microbicida.....	116
Figura 35: Resultados da recuperação microbiana na emulsão óleo/água e dos biofilmes formados nas superfícies das lâminas de aço carbono após o uso da estratégia de choque.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos métodos de limpeza de metais.....	25
Tabela 2: Locais susceptíveis a formação de biofilmes e seus efeitos adversos.....	29
Tabela 3: Comparação entre os dispositivos mais utilizados para a formação de biofilmes.....	30
Tabela 4: Função dos polímeros extracelulares no biofilme.....	39
Tabela 5: Mecanismos de ação dos principais agentes antimicrobianos.....	42

Tabela 6: Exemplos de homosslerinas lactonas produzidas por microrganismos e características fenotípicas resultantes de sua expressão.....	48
Tabela 7: Composição das partículas utilizadas, fornecidas pelo fabricante.....	54
Tabela 8: Classificação das superfícies de acordo com sua intensidade de brilho.....	56
Tabela 9: Primers utilizados nas análises das comunidades microbianas por PCR-DGGE.....	62
Tabela 10: Concentração de antimicrobianos utilizados nos testes de susceptibilidade dos biofilmes.....	64
Tabela 11: resultados da classificação dos materiais de acordo com a intensidade de brilho.....	73
Tabela 12: Diâmetro médio, massa das amostras analisadas, área superficial específica média e volume específico médio das partículas dos diferentes materiais	74
Tabela 13: Resultados das áreas superficiais totais determinadas pelos métodos de BET, BJH e DH.....	75
Tabela 14: Resultados do volume de poros determinados pelos métodos de saturação de poros, BJH e DH.....	76
Tabela 15: Resultados dos diâmetros médios de poros determinados por saturação dos poros (média) e pelos modelos BJH e DH.....	76
Tabela 16: Resultados da medição do ângulo de contato.....	83
Tabela 17: Resultados da caracterização por comparação simultânea entre os materiais utilizados.....	85
Tabela 18: Quantificação da população microbiana encontrada no fluido de corte contaminado utilizado como inóculo nos testes de erradicação.....	86
Tabela 19: Quantificação da população de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em suspensão.....	91

Tabela 20: Concentrações Mínimas de Erradicação dos Biofilmes (CMEB) determinadas para os diferentes biocidas testados.....	108
Tabela A 4.1: Distribuição dos materiais nos sete segmentos industriais pesquisados.....	141
Tabela A 4.2: Resultados obtidos através do questionário quanto ao nível de conhecimento dos pontos críticos da área fabril nos 7 segmentos industriais avaliados.....	142
Tabela A 4.3: Resultados obtidos através do questionário quanto à existência de cronograma e de procedimento de limpeza e sanitização industrial.....	143
Tabela A 4.4: Resultados da curva de crescimento dos biofilmes nas cinco superfícies testadas.....	144
Tabela A 4.5: Resultados da curva de crescimento do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na superfície dos cinco materiais.....	145
Tabela A 4.6: Resultados da curva de crescimento dos biofilmes resultantes do óleo de corte contaminado com acréscimo de meio de cultura fresco após 48 horas de incubação.....	146
Tabela A 4.7: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de vidro, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100.....	147
Tabela A 4.8: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de aço carbono, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100.....	148

Tabela A 4.9: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de aço inoxidável, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100.....	149
Tabela A 4.10: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de PVC, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100.....	150
Tabela A 4.11: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de alumínio, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100.....	151
Tabela A 4.12: Resultados da susceptibilidade, em termos da variação da concentração celular por massa de material, dos biofilmes formados na superfície dos materiais aos microbicidas em concentrações 10 vezes maiores que as indicadas pelo fabricante.....	152
Tabela A 4.13: Resultados da susceptibilidade, em termos da variação da concentração celular por área, dos biofilmes formados na superfície dos materiais aos microbicidas em concentrações 10 vezes maiores que as indicadas pelo fabricante.....	153
Tabela A 4.14: Resultados da recuperação microbiana dos biofilmes formados na superfície das lâminas (com dimensões de 2,75 cm x 7,5 cm) de vidro, aço carbono e aço inoxidável.....	154
Tabela A 4.15: Resultados da recuperação microbiana dos biofilmes formados na superfície das lâminas (com dimensões de 2,75 cm x 7,5 cm) de PVC e alumínio, e das células em suspensão.....	155

Tabela A 4.16: Resultados da recuperação da população microbiana dos biofilmes e da emulsão e do residual de triazina no sistema com 0,1% de microbicida.....	156
Tabela A 4.17: Resultados da recuperação da população microbiana dos biofilmes e da emulsão e do residual de triazina no sistema com 0,2% de microbicida.....	157
Tabela A 4.18: Resultados da recuperação microbiana na emulsão óleo/água e dos biofilmes formados na superfície das lâminas de aço carbono após o uso da estratégia de choque por 3 dias consecutivos.....	158

RESUMO

Recentemente os biofilmes vêm sendo considerados um dos principais problemas de contaminação de instalações e equipamentos industriais. A presença de biofilmes na indústria pode causar problemas tais como o entupimento de tubulações e filtros, o aumento no custo de capital e de produção devido à troca prematura de equipamentos e ao reprocesso de produtos acabados contaminados, além de, em alguns casos, aumentar o risco à saúde ocupacional dos trabalhadores.

O presente estudo teve como objetivo analisar biofilmes formados na superfície de diferentes materiais utilizados em instalações e equipamentos industriais, com o intuito de avaliar a influência destes materiais na estrutura, maturação e susceptibilidade dos biofilmes ao tratamento com diferentes tipos de microbicidas. Para tanto, os materiais utilizados como corpos-de-prova nesta pesquisa foram definidos a partir de levantamento efetuado em 400 empresas de diferentes segmentos de mercado. Alumínio, aço carbono, aço inoxidável, policloreto de vinila (PVC) e vidro foram selecionados.

O estudo foi realizado empregando como suporte partículas destes materiais com aproximadamente 1 mm de diâmetro e lâminas dos mesmos com dimensões de 2,5 cm por 7,5 cm. Como inóculo utilizou-se fluido de corte naturalmente contaminado oriundo de uma empresa de usinagem de metais do estado de São Paulo. Os materiais foram caracterizados quanto à rugosidade, ao seu índice de brilho, hidrofobicidade e porosidade.

Apesar das diferentes características apresentadas pelos materiais indicarem maior tendência de formação dos biofilmes em alumínio e aço carbono, observou-se que a formação de biofilmes foi muito similar em todos os materiais testados. A população celular recuperada dos mesmos variou de $1,58 \times 10^6$ UFC/cm² para o vidro a $4,36 \times 10^6$ UFC/cm² para o aço carbono, observando-se que quando o inóculo é formado por uma cultura mista adaptada ao sistema, os fatores que regulam a adsorção, fixação e a posterior proliferação celular não são necessariamente ligados ao tipo de superfície e sim à natureza da população microbiana e ao tempo que os micro-organismos permanecem em contato com os nutrientes.

Comportamento similar foi verificado nos testes de erradicação dos biofilmes, nos quais não se observou variação da resposta com o tipo de superfície testada. Notou-se, em todos os casos, que o microbicida mais eficaz foi o FBP-183, com dosagem requerida 50 vezes maior que a de uso recomendado pelo fabricante para células suspensas, enquanto que o microbicida BP-509 apresentou a menor eficiência.

ABSTRACT

Recently, biofilms have been considered one of the main problems of contamination of industrial facilities and equipment. The presence of biofilms in the industry can cause problems such as clogging of pipes and filters, increased capital and production costs due to premature change of equipment and reprocessing of contaminated finished products, and in some cases, it also increases the risk of occupational health of workers.

This study aimed to examine biofilms formed on the surface of different materials used in industrial facilities and equipment, in order to evaluate the influence of these materials in the structure and maturation of the biofilms as well as on their susceptibility to treatment with microbicides. For that purpose, the materials used in this study were defined based on a survey conducted on 400 companies from different market segments. Aluminum, plain carbon steel, stainless steel, polyvinyl chloride (PVC) and glass were selected.

The study was performed using particles with approximately 1 mm in diameter and coupons of the same materials with dimensions of 2.5 cm by 7.5 cm. Naturally contaminated cutting fluid from a metal processing company in the state of São Paulo was used as inoculum. The materials were characterized for roughness, brightness index, hydrophobicity and porosity.

Despite the different characteristics presented by the materials indicated a greater tendency to the formation of biofilms on aluminum and carbon steel, it was observed that biofilm formation in these conditions was very similar in all five material types tested. The cell population recovered from the same materials ranged from 1.58×10^6 UFC/cm² for glass to 4.36×10^6 UFC/cm² for carbon steel. It was observed that when the inoculum consists of a mixed culture adapted to the system, the factors that governs the adsorption, fixation and subsequent cell proliferation are not necessarily associated to the type of surface but rather to the nature of the microbial population present and the time that the micro-organisms remain in contact with the nutrients.

Similar behavior was observed in tests for the eradication of biofilms, where there was no change in response to the type of surface tested. It was noted in all cases that the most effective microbicide was the FBP-183, with required dosage 50 times higher than that recommended by the manufacturer for contaminants in suspension, while the microbicide BP-509 had the lowest efficiency.

1. INTRODUÇÃO

Biofilmes vêm sendo estudados na área médica e odontológica há mais de 60 anos, porém somente nos últimos anos têm sido aprofundados os estudos sobre biofilmes microbianos como a principal causa de surtos de contaminação em diversos segmentos industriais (Dolan, 2002 e Denkh *et al.* 2007). Estas contaminações, normalmente, são de difícil controle e conseqüentemente observa-se com freqüência o fracasso dos tratamentos de erradicação tradicionais utilizados (Drenkard, 2003).

Biofilme microbiano é definido como uma associação de células microbianas aderidas (fixadas) a uma superfície seja biótica ou abiótica (Ceri *et al.*, 2001). Estas células são envoltas por uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (EPS) que confere a esta comunidade maior resistência aos agentes antimicrobianos quando comparadas aos micro-organismos livres. Pasmore e Costerton (2003) afirmam que quando na forma de biofilmes, os micro-organismos são capazes de estabelecer colônias sobre tipos de materiais distintos e em condições extremas de nutrição, tendo facilitado a comunicação intercelular através de moléculas sinalizadoras, chamado de “*Quorum Sensing*”.

Segundo Flemming e Wingender (2010), a EPS pode variar sua composição dependendo dos micro-organismos presentes no biofilme. A EPS é formada por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e fosfolipídios, e não só fornece proteção para as células formadoras dos biofilmes, como também desempenha papel importante na morfologia, estrutura orgânica e operacional do biofilme, facilitando o arranjo espacial das diferentes espécies que compõe o biofilme (Lennox *et al.*, 2006 e Flemming e Wingender, 2010), além de ser considerada como fator importante no processo de adesão das bactérias, segundo autores como Teschke (2005).

Mais de 90% dos contaminantes existentes em qualquer processo fabril que possua água em circulação ocorrem na forma aderida, sendo a formação do biofilme atualmente considerada como uma das fases do ciclo de vida dos micro-organismos (Klemm *et al.*, 2010). Na área da saúde estima-se que os biofilmes microbianos sejam responsáveis por 65% das infecções em humanos (Nascimento e Taveira, 2005). Todos

os dispositivos médicos (como por exemplo, os catéteres e as sondas), são susceptíveis à contaminação por biofilmes e quando estes não são adequadamente tratados, são responsáveis direta ou indiretamente pelo fracasso de tratamentos terapêuticos tradicionais (Sepandj *et al.*, 2003).

O estudo em laboratório das causas das contaminações microbianas utilizando-se somente micro-organismos em cultura pura e na forma planctônica (células livres em suspensão), pela chamada microbiologia tradicional, muitas vezes leva a resultados que não condizem com a realidade dos processos fabris, pois *in loco* os micro-organismos não são encontrados isoladamente e sim em comunidades com indivíduos de espécies diferentes.

O controle da contaminação industrial tornou-se imprescindível para empresas de um grande número de atividades, contribuindo assim para a diminuição de gastos com reprocesso de produtos acabados, troca prematura de materiais e equipamentos, atrasos, dentre outros problemas. O controle da contaminação por biofilmes pode ser baseado no tripé formado pelas seguintes bases fundamentais: a) implantação das Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF e C); b) definição do agente de desinfecção mais adequado para o processo e sua real concentração para erradicar os micro-organismos que ocorrem no processo; e c) implantação de cronograma de limpeza e sanitização eficaz para toda a área fabril.

A associação destas três bases é responsável, se não pela eliminação, pelo menos pela diminuição da contaminação microbiana em diversos segmentos industriais. Muitos processos fabris não possuem ao menos uma das três bases citadas acima, ou seja, há um desequilíbrio que pode terminar por resultar em surtos de contaminação recorrentes (ANVISA, Portaria nº 348, 1997).

No segmento de usinagem de metais que se utiliza de óleo (fluido) de corte (*metalworking fluid*), a contaminação por biofilmes é uma constante, resultando em alterações físico-químicas na emulsão óleo/água, o que pode levar uma empresa a descartar milhares de litros deste fluido, causando sérios problemas ambientais e um elevado custo com a reposição desta emulsão (Runge e Duarte, 1990).

A denominação “fluido de corte” é aplicável a qualquer fluido usado no corte e na

usinagem de metais ou outros materiais. Geralmente, este consiste de uma emulsão de óleo mineral em água (cinco a oito por cento de óleo e 92 a 95% de água), sendo que esta emulsão é altamente susceptível ao ataque de micro-organismos e à formação de biofilmes, além de ser muito poluente (Fogo, 2008).

O fluido de corte é um produto altamente susceptível à contaminação microbiana, devido a sua elevada quantidade de nutrientes, à presença de água em abundância, às temperaturas de processo, ao local de armazenagem e à falta de boas práticas de fabricação e controle.

O principal motivo para se descartar uma emulsão óleo/água é a contaminação microbiana. Segundo a Brasquip Ambiental S.A., empresa do estado de São Paulo especializada em descarte e reciclagem de óleos emulsionados, somente em 2009 foi registrado o descarte de mais de oito milhões de litros da emulsão óleo/água. Existem diversos meios para se tratar o fluido de corte antes do descarte, os mais utilizados são processos do tipo evaporativo, físico-químico contínuo, físico-químico em batelada, ultra-filtração e termocompressão. O custo estimado para o descarte de uma tonelada do fluido de corte, em empresas especializadas no tratamento deste efluente, varia entre R\$ 280,00 a R\$ 430,00, dependendo da formulação do fluido de corte e do processo utilizado (Brasquip Ambiental S.A., 2009), mas uma maneira alternativa de contornar o problema é abordar de forma sistemática a questão da contaminação microbiana.

Com base nos fatos acima descritos, uma das motivações para o desenvolvimento deste trabalho é o fato de não haver registro sistemático na literatura suficiente para explicar os problemas relacionados às contaminações industriais e às oscilações de adesão microbiana em equipamentos, tubulações e utensílios industriais. Assim, o controle com produtos químicos é prejudicado, pois o biofilme formado em diferentes superfícies geralmente apresenta resistência diferenciada ao longo do tempo aos tratamentos convencionais.

Com isso, o presente estudo propõe analisar a formação de biofilmes nativos ou “selvagens” e mistos, a partir de inóculos constituídos de fluido de corte contaminado, na superfície dos principais materiais de construção industrial utilizados hoje no Brasil.

Além de focar a formação destes biofilmes, o presente trabalho visa também o desenvolvimento de uma metodologia para a escolha do microbicida mais adequado, a sua concentração ideal para erradicar cada tipo de biofilme formado e verificar a interferência no tipo de material utilizado.

2. OBJETIVO

Este estudo tem por objetivo geral analisar os biofilmes formados a partir do óleo de corte naturalmente contaminado sobre a superfície de diferentes materiais de uso na indústria brasileira, visando verificar também a influência destes materiais na estrutura, maturação e susceptibilidade dos biofilmes a biocidas. Para alcançar este objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a. definir os materiais utilizados na instalação industrial que serão utilizados nos ensaios;
- b. analisar a adoção das Boas Práticas de Fabricação pelas indústrias dos seguintes segmentos: tintas e revestimentos, papel, farmacêutica, polímeros, cosméticos, domissanitários e usinagem de metais;
- c. caracterizar as superfícies de materiais de aço carbono, aço inoxidável, policloreto de vinila (PVC), alumínio e vidro quanto à rugosidade, índice de brilho (grau de polimento) e porosidade;
- d. caracterizar o fluido de corte quanto à microbiota nativa, por cultivo tradicional;
- e. caracterizar e comparar por microscopia eletrônica de varredura a formação dos biofilmes na superfícies compostas por aço inoxidável, aço carbono, PVC, alumínio e vidro;
- f. caracterizar a população microbiana dos biofilmes formados nas superfícies compostas por aço inoxidável, aço carbono, PVC, alumínio e vidro pela técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante.
- g. determinar a concentração de agentes antimicrobianos para erradicação dos biofilmes formados na superfície de vidro, aço carbono, aço inoxidável, alumínio e PVC;
- h. determinar a dosagem mínima de agente antimicrobiano requerida para manter um residual de biocida em um sistema, para retardar ou impedir a adesão microbiana;

- i. verificar as dosagens de choque necessárias para se eliminar biofilmes formados em superfícies compostas por vidro, aço carbono, aço inoxidável, alumínio e PVC.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A contaminação microbiana de produtos, equipamentos e instalações pode causar danos à saúde humana, além de custos com o descarte de materiais, a troca prematura de equipamentos e tubulações. A eliminação ou a diminuição de contaminações constitui uma exigência crescente dos produtos industrializados, principalmente por parte dos consumidores e também por parte dos órgãos responsáveis pelo acompanhamento e vigilância de cada país, sendo um dos pilares das Boas Práticas de Fabricação nos diferentes segmentos industriais. No Brasil, por exemplo, podem ser citadas as portarias e resoluções da ANVISA e do Ministério da Saúde (MS) listadas a seguir:

- Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 275, de 21 de outubro de 2002, da ANVISA: Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos;
- Portaria número 348, de 18 de agosto de 1997, da ANVISA: determina a todos os estabelecimentos produtores de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, o cumprimento das Diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico - Manual de Boas Práticas de Fabricação para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes;
- Portaria número 326, de 30 de junho de 1997, do Ministério da Saúde (MS): aprova o Regulamento Técnico "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores Industrializadores de Alimentos";
- Portaria número 327, de 30 de julho de 1997, da Secretaria da Vigilância Sanitária (SVS) e o Ministério da Saúde (MS): determina a todos os estabelecimentos produtores de Saneantes Domissanitários o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelos Regulamentos Técnicos - Boas Práticas de

Fabricação e Controle (BPF e C) e revoga a Portaria n. 58, de 12 de julho de 1995;

- Portaria número 368, de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA): aprova o regulamento técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para Estabelecimentos Elaboradores e Industrializadores de Alimentos;
- Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 210, de 04 de agosto de 2003, da ANVISA: regulamenta as Boas Práticas de Fabricação. Deve ser tomada como referência na inspeção de instalações da fábrica, dos processos de produção e controle de qualidade e como material de treinamento dos inspetores na área de medicamentos, assim como no treinamento de profissionais responsáveis pelo processo de produção e de controle de qualidade nas indústrias;
- Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 59, de 27 de junho de 2000, da ANVISA: determina a todos os fornecedores de produtos médicos o cumprimento dos requisitos estabelecidos pelas "Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos".

Erradicar ou minimizar riscos microbiológicos é uma tarefa que exige grande empenho, tanto para os pequenos como para os grandes fabricantes, seja em uma instalação com tecnologia de produção convencional ou mais moderna. O assunto envolve diferentes áreas do conhecimento dentro de uma empresa, principalmente pesquisa e desenvolvimento, manufatura, controle de qualidade, suprimentos e *marketing*. Assim, o controle da contaminação de produtos é um desafio para vários profissionais e sua superação é de suma importância para a adequação da indústria à competitividade do mercado.

Estes desafios existem não somente na fase de desenvolvimento do produto, mas também incluem o próprio processo de fabricação, estendendo-se até o final do prazo de validade do produto, mesmo estando este em poder do consumidor final. A principal diferença entre um fabricante e outro é o estágio em que cada um se encontra em relação à implantação das Boas Práticas de Fabricação e Controle, ao uso correto

dos conservantes e sanificantes e ao investimento nos profissionais que estão envolvidos no processo fabril (denominados de colaboradores). Este investimento é necessário para desenvolver e aplicar novas técnicas, obter maior disciplina e cooperação na obediência às normas através da constante reciclagem de conhecimentos e conscientização sobre procedimentos e padrões de qualidade microbiológica (Siqueira, 2005).

Além das BPF, a utilização de conservantes e desinfetantes é de grande importância, pois os formuladores e microbiologistas precisam compreender a função química dos antimicrobianos utilizados e conhecer os micro-organismos envolvidos, tanto aqueles inerentes ao processo como os contaminantes indesejados instalados no sistema. A aplicação do microbicida de forma correta é muito importante para assegurar que a contaminação indesejada não chegue ao produto final, porém, a tendência do mercado hoje é a de minimizar a utilização de aditivos químicos, investindo maior cuidado na prevenção e controle da contaminação (Siqueira, 2005).

A sanitização pode ser definida como um conjunto de procedimentos (pessoal, ambiental e de processo) que visa diminuir a população de micro-organismos indesejáveis ou nocivos, sem necessidade de recorrer à esterilização. É um dos requisitos mais importantes nas BPF, um rigoroso critério de controle e utilização de antimicrobianos para cada finalidade específica. No Brasil, estes critérios são estabelecidos pelos órgãos e entidades governamentais, tais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), dentre outros. Ou seja, nem todos os agentes antimicrobianos podem ser utilizados para todas as aplicações, cada empresa deve seguir as normas estabelecidas para cada segmento para a utilização dos agentes antimicrobianos mais apropriados (ANVISA, RDC 275, 2002; ANVISA, RDC210, 2003; Ministério da Saúde, Portaria 326, 1997).

A eficácia da sanitização depende basicamente de duas etapas que devem ser estipuladas e seguidas com critério. A primeira é a remoção mecânica das incrustações ou por jato de alta pressão. Nesta etapa, cerca de 90% do biofilme instalado é removido. A segunda etapa consiste na aplicação do desinfetante, que elimina os 10%

restantes. Normalmente a empresa possui um plano de sanitização no qual são definidos alguns critérios, como: o que sanitizar, com qual sanificante, como efetuar a sanitização, como proceder, quem irá efetuá-la, qual a frequência, qual o melhor momento e como controlar os resultados da sanitização.

Estas etapas são fundamentais para a manutenção do controle da contaminação microbiana nos equipamentos e nas instalações. A utilização do material de construção adequado para determinada aplicação pode minimizar o custo decorrente da adição de conservantes e de constantes sanitizações.

Desde o início do desenvolvimento humano os materiais estão intimamente relacionados à nossa cultura. Mesmo as fases do desenvolvimento das civilizações podem ser classificadas em relação aos materiais, por exemplo, Idade da Pedra, Idade do Cobre, Idade do Bronze e Idade do Ferro.

Inicialmente, os seres humanos utilizavam um número restrito de materiais (ditos naturais), tais como, pedra, madeira, pele, argila, dentre outros. Posteriormente, foram desenvolvidas técnicas para a produção de novos materiais com propriedades diferentes dos naturais, por exemplo, vidro, cerâmica, metais (Callister, 2002).

Mais recentemente, foram elucidadas as relações entre a estrutura e as propriedades dos materiais. Com isso, milhares de diferentes materiais foram desenvolvidos nos últimos anos, com características que atendem às necessidades de sua utilização.

Atualmente, o estudo dos materiais (estrutura e características) é fundamental, pois assim pode-se definir qual material é mais aplicável para cada utilização. Muitas vezes o aspecto econômico é o que prevalece na escolha do material apropriado, o que posteriormente poderá comprometer a vida útil dos equipamentos e o controle microbiológico do sistema. Sendo assim, a escolha do material adequado deve ser criteriosa para cada segmento, englobando aspectos como condições de uso, deterioração permissível do material durante a operação/execução do projeto e custo (Callister, 2002).

3.1. Materiais Comumente Empregados no Setor Industrial

Até o final da década de 80, uma das grandes preocupações da área de engenharia, em geral, era a construção de empresas com materiais resistentes, com foco, principalmente, na resistência à corrosão, dureza e ductilidade. Recentemente, um grave problema nas indústrias tem sido a formação de biofilmes microbianos nos mesmos, evidenciando a necessidade de resistência também à biocorrosão.

Segundo Siebert e Stoecher II (1999), é de suma importância considerar, além das características do sistema e do produto de interesse, também os fatores externos, como exposição a intempéries, localização, ventilação. Para isso, conhecer as características e o comportamento dos materiais é essencial para minimizar os processos de corrosão e biocorrosão.

A determinação do tipo de material para cada equipamento deve basear-se na especialidade de cada segmento industrial, evitando incompatibilidades entre produto e equipamento. Dentre os tipos de materiais cujo uso se destaca em processos industriais podem ser citados o vidro, os metais, as ligas metálicas (como o aço) e os polímeros, sucintamente descritos a seguir.

3.1.1. Vidro

Segundo a Associação Técnica Brasileira das Indústrias Automáticas de Vidro (ABIVIDRO): “vidro é uma substância inorgânica, amorfa e fisicamente homogênea, obtida por resfriamento de uma massa em fusão que endurece pelo aumento contínuo da viscosidade até atingir a condição de rigidez, mas sem sofrer cristalização”.

Industrialmente pode-se restringir o conceito de vidro aos produtos resultantes da fusão (pelo calor) de óxidos (ou de seus derivados) e misturas, tendo em geral como constituinte principal a sílica ou o óxido de silício (SiO_2) que, pelo resfriamento, endurecem sem cristalizar (ABIVIDRO, 2011).

O vidro há muito tempo é considerado um dos principais materiais utilizados nos mais diferentes contextos. Por ser reciclável, nos últimos anos, novamente vem sendo

utilizado como embalagem, principalmente devido a questões ambientais. O vidro é o único material que possui três qualidades imprescindíveis no contexto ambiental e econômico: é 100% reciclável, pois não perde suas características quando retrabalhado; é retornável, podendo ser utilizado várias vezes (exemplo: garrafas); e também é reutilizável, ou seja, é usado para outras finalidades além daquela para a qual foi fabricado (ABIVIDRO, 2011).

Na indústria, dentre os diversos tipos de vidros, a escolha é efetuada de acordo com sua utilização, principalmente, devido às características e propriedades obtidas através da alteração de seus componentes.

Dentre suas principais vantagens pode-se destacar sua resistência em ambientes corrosivos, a capacidade de não reagir com outros materiais (impedindo ou dificultando a contaminação química cruzada), sua resistência térmica, ótica e acústica, a relativa facilidade de limpeza e a transparência. Embora o vidro comum não resista a choques térmicos, existem vidros especiais que suportam alterações bruscas de temperatura. Entretanto, sua principal desvantagem é a baixa resistência mecânica, o que impede ou dificulta seu uso industrial em larga escala, com exceção das indústrias farmacêuticas e de especialidades químicas (ABIVIDRO, 2011).

Visto que a grande maioria das indústrias necessita de materiais com maior resistência mecânica que o vidro, a principal alternativa é a substituição por metais. Contudo, nesta classe de materiais encontram-se grandes variações e particularidades, provenientes de suas propriedades, conforme discutido a seguir.

3.1.2. Metais

Estudar as propriedades mecânicas dos metais é de suma importância para que se possa selecioná-los de maneira correta, a fim de que não ocorra deformação e/ou falha em altos níveis, evitando-se a fratura do material (Guy, 1980), e custo com substituições após determinado período de utilização. A *American Society for Testing and Materials* (ASTM) possui normas estabelecidas de ensaios, que devem ser efetuados e conduzidos de maneira criteriosa para a verificação destas propriedades.

As ligas metálicas são divididas em ferrosas, nas quais predomina o ferro como componente principal, e as não ferrosas, que não possuem ferro como base. Existem variadas técnicas de fabricação dos metais, conforme mostra a Figura 1.

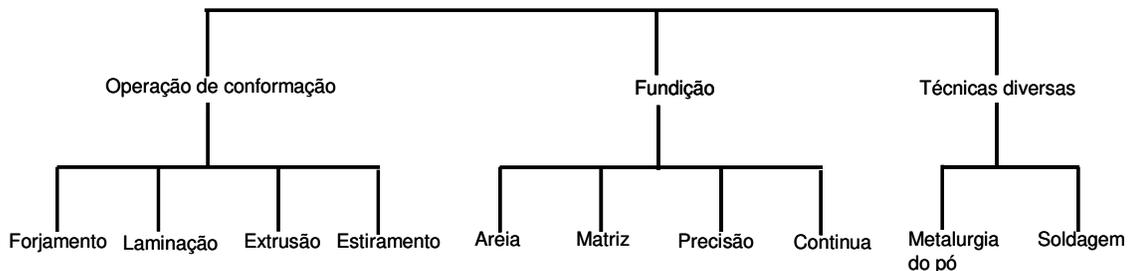


Figura 1: Técnicas de fabricação de metais (adaptada de Callister, 2002).

O tipo de processo a ser empregado no trabalho em metais varia conforme a característica mecânica da matéria-prima, e essas características são dadas pela presença de elementos de liga tais como: carbono, cromo, manganês e enxofre, dentre outros (Callister, 2002).

A Figura 2 mostra sucintamente a divisão das diversas ligas metálicas ferrosas. O aço carbono comum, aço inoxidável e ferro fundido são os materiais ferrosos mais amplamente utilizados; a principal diferença entre eles se dá pela constituição química da liga. Os três materiais são constituídos, basicamente, de ferro e carbono, porém a diferença está na porcentagem de carbono e na adição de outros elementos de liga.

O aço carbono comum possui somente os elementos ferro e carbono, sendo que a porcentagem máxima de carbono é de 2,10%. Acima deste percentual, a liga é chamada de ferro fundido (carbono entre 2,11 e 14%). O aço inoxidável é um tipo de aço carbono que possui outros elementos de liga, principalmente, o cromo e o níquel. A sua composição química é balanceada de maneira a obter melhor resistência à corrosão (Callister, 2002).

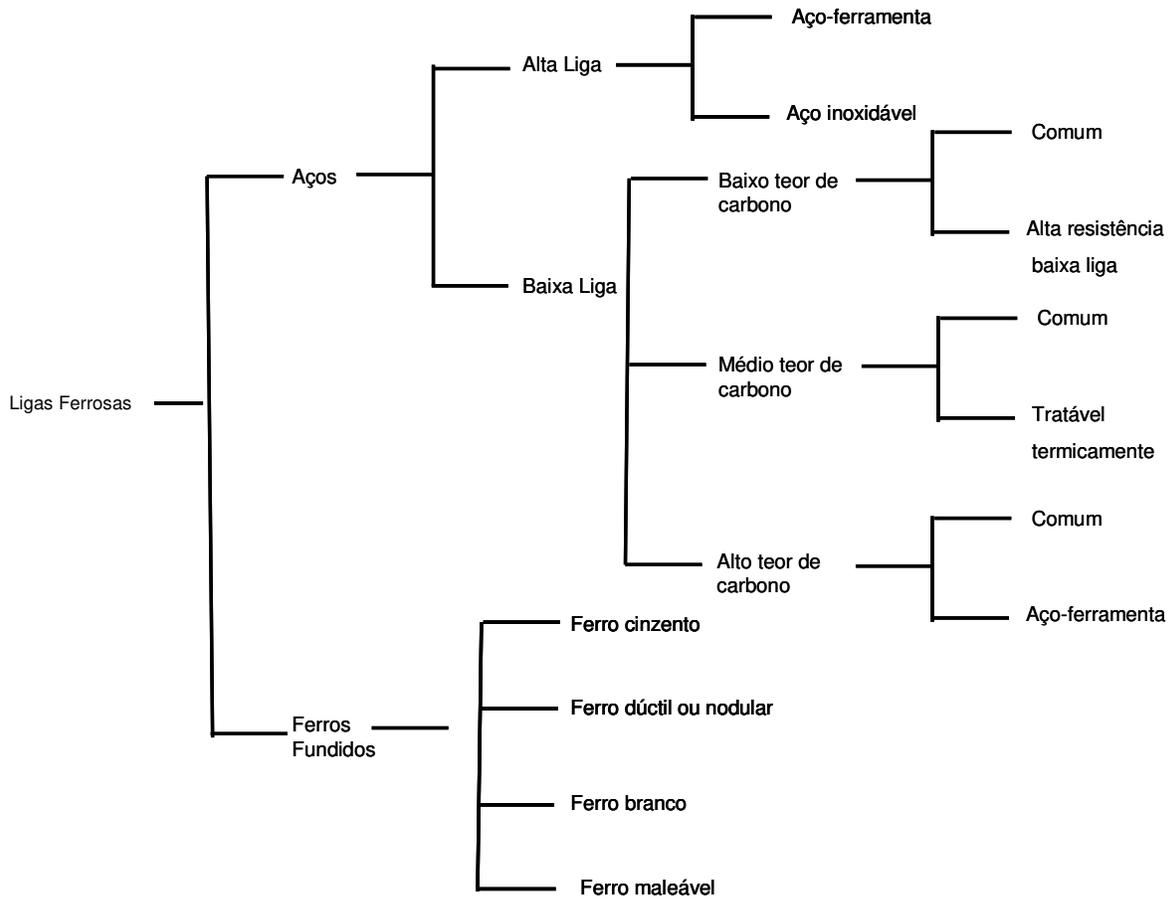


Figura 2: Classificação das ligas ferrosas (adaptada de Callister, 2002).

3.1.2.1. Aço Carbono

O aço carbono consiste de ligas de ferro-carbono e suas propriedades mecânicas estão ligadas diretamente ao teor de carbono, normalmente inferior a 2,10%. A porcentagem de carbono e a temperatura de produção podem alterar as características do aço, como o comportamento alotrópico, aspecto granulométrico, e principalmente, as propriedades mecânicas, pois quanto maior a concentração de carbono, maior será a dureza. Porém, concentrações de carbono superiores a 2,5% deixam o aço mais frágil e quebradiço.

Com base nas porcentagens de carbono em sua constituição, o aço é

classificado como de baixo, médio e alto teor de carbono.

De acordo com a *Society of Automotive Engineers* (SAE) e o *American Iron and Steel Institute* (AISI), o aço carbono comum é classificado como AISI-SAE 10XX. O numeral 10 descreve que esta liga refere-se ao aço carbono comum e o código XX indica a porcentagem de carbono presente na liga.

O aço carbono é o metal mais comum, mais barato e mais versátil dentre os materiais metálicos. Dentre suas principais vantagens destacam-se a excelente ductilidade, a fácil soldagem, além de ser mais leve que o chumbo, porém três vezes mais pesado que o alumínio. A resistência à corrosão depende da camada de óxido formada na superfície. O aço carbono comum é utilizado em alguns tipos conexões, canaletas, estruturas de fundações e tubulações, dentre outras aplicações.

3.1.2.2. Aço Inoxidável

O termo aço inoxidável é empregado para identificar aços contendo, no mínimo, 11% de cromo, o que garante aos mesmos uma elevada resistência à corrosão, pois a combinação do oxigênio do ar com o cromo do aço forma uma película na superfície da liga chamada de camada passiva que é extremamente fina, contínua, estável e muito resistente ao ataque de elementos provenientes do ambiente (Runge e Duarte, 1990).

A camada passiva desempenha um papel fundamental, eliminando uma etapa do processo, ou seja, a necessidade de revestimentos protetivos externos como fosfatização, pintura, galvanização, bicromatização, dentre outros.

Existem mais de 70 tipos padronizados de aços inoxidáveis, que podem ser produzidos tanto na forma laminada quanto na forma fundida. Em geral são constituídos por 12-30% de cromo, de zero a 22% de níquel, com baixo teor de carbono, nióbio, cobre, molibdênio, selênio e titânio. Embora seja altamente resistente, esta resistência pode ser aumentada com a adição de níquel e molibdênio em sua composição. É um dos metais mais utilizados a baixíssimas temperaturas (materiais criogênicos).

Em geral, segundo Tebecherani (2011), os aços inoxidáveis são divididos de acordo com sua microestrutura e suas diversas utilizações em martensíticos ao cromo,

ferríticos ao cromo, e austeníticos.

Os aços inoxidáveis martensíticos são aços magnéticos que podem atingir altas durezas por tratamento térmico, além de apresentar excelente resistência mecânica. São empregados na confecção de artigos para cutelaria, instrumentos de medida, lâminas de corte, correntes para máquinas, discos de freio, dentre outros.

Os aços inoxidáveis ferríticos também são magnéticos, normalmente são endurecidos por conformação a frio e utilizados no estado recozido. Sua aplicação é recomendada para a fabricação de moedas, baixelas, fogões, geladeiras, pias, sistemas de exaustão de gases em motores de explosão e recheio de colunas de destilação.

E, por último, vêm os aços austeníticos, que diferentemente dos anteriores, não são magnéticos, e podem ser endurecidos por trabalho mecânico. Apresentam resistência à corrosão melhorada quando adicionado níquel e são facilmente conformados a frio, devido a uma combinação favorável de propriedades mecânicas. São utilizados para fins estruturais, em equipamentos para indústria alimentícia, aeronáutica, ferroviária, petrolífera, química e petroquímica, papel e celulose e na construção civil.

Dentre as principais vantagens na utilização do aço inoxidável destacam-se sua elevada resistência à corrosão e a facilidade de ser trabalhado e moldado, aceitando deformações permanentes sem o comprometimento de suas características, a facilidade de limpeza e manutenção (por apresentar superfície lisa), alta resistência mecânica e a meios agressivos. Contudo, sua principal desvantagem é ser um dos materiais mais caros dentre os metais (Tebecherani, 2011).

3.1.3. Polímeros

Os polímeros são substâncias constituídas por unidades estruturais de origem orgânica ou inorgânica, chamadas de monômeros. Os monômeros, em repetição, são ligados uns aos outros (por polimerização), em quantidade suficiente para formar o polímero e fornecer ao mesmo um conjunto de propriedades que não variam

acentuadamente com a adição ou a remoção de uma ou algumas das unidades que o constituem (Instituto do PVC, 2011).

Segundo o Instituto do PVC (2011) uma das principais e mais importantes características dos polímeros refere-se a suas propriedades mecânicas. Os polímeros podem ser divididos em termoplásticos, termo-endurecíveis (termofixos) e elastômeros (borrachas).

Os termoplásticos, também chamados de plásticos, são os mais encontrados no mercado. Podem ser fundidos diversas vezes e em alguns casos podem até dissolver-se em vários solventes, possibilitando sua reciclagem, característica importante e desejável atualmente.

Os termorrígidos (termofixos) são polímeros rígidos e frágeis, porém muito estáveis a variações de temperatura. Uma vez produzidos, não mais se fundem. O aquecimento do polímero acabado promove decomposição do material antes de sua fusão, tornando inviável sua reciclagem.

Os elastômeros (borrachas) constituem a classe intermediária entre os termoplásticos e os termorrígidos. Não se fundem, mas apresentam alta elasticidade, por não serem tão rígidos como os termofixos. A reciclagem é dificultada pela incapacidade de fusão (Instituto do PVC, 2011).

Um dos polímeros mais frequentemente empregados industrialmente é o policloreto de vinila (PVC), discutido a seguir.

3.1.3.1. PoliCloreto de Vinila (PVC)

O polietileno é quimicamente o polímero mais simples, obtido pela polimerização do etileno sob alta pressão. Embora o polietileno de baixa densidade (PEBD) seja o termoplástico mais utilizado no mundo (bolsas e sacolas de todo tipo, embalagens de alimentos, frascos em geral, etc.), não é de grande aplicabilidade em instalações industriais (como material de construção) devido a sua baixa resistência mecânica (Vinhas, *et al.*, 2005).

O PVC é um polímero de adição, ou seja, obtido a partir de monômeros que

contêm pelo menos uma dupla ligação (Figura 3). O PVC é o segundo termoplástico mais consumido em todo o mundo, devido a suas características, que podem ser alteradas de acordo com os objetivos de sua aplicação final, mudando-se os tipos de aditivos de sua composição (Vinhas, *et al.*, 2005).

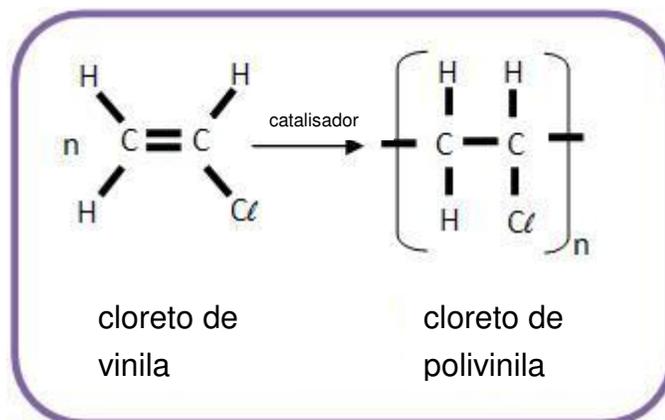


Figura 3: Estrutura geral de um PVC (Instituto do PVC, 2011).

De acordo com Souza *et al.* (2006), a resina de PVC é atóxica e é compatível com variados aditivos, o que permite a fabricação de diversos tipos de produtos, como filmes, lacres, laminados, brinquedos, acessórios médicos, revestimentos, além daqueles aplicados na construção civil e em indústrias automobilísticas, dentre outros. Industrialmente destaca-se seu uso em tubulações.

Dentre as principais vantagens da utilização do PVC podem-se destacar, principalmente, a sua leveza, durabilidade, resistência à maioria dos agentes químicos, isolamento térmico, elétrico e acústico, impermeabilidade a gases e líquidos, durabilidade, facilidade de reciclagem e o baixo consumo de energia em sua fabricação.

Entre as desvantagens destacam-se a baixa resistência à fratura, baixa estabilidade térmica e a formação de fumaça escura e tóxica durante sua combustão.

3.1.4. Alumínio

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, porém não é encontrado puro na natureza. É o metal mais novo utilizado em escala industrial.

Segundo a Associação Brasileira de Alumínio (ABAL, 2011), suas características permitem que este tenha uma diversa gama de aplicações, por isso, é um dos materiais mais utilizados no mundo. O alumínio se sobressai, principalmente em função de seus vários atributos, tais como: condutividade elétrica e térmica, impermeabilidade e opacidade, alta relação resistência/peso, maleabilidade, resistência à corrosão, dureza, beleza, leveza, durabilidade, possibilidade de diferentes acabamentos, além de ser reciclável (ABAL, 2011).

Como desvantagens, destacam-se a necessidade de tratamento anticorrosão dependendo do ambiente em que é utilizado, a dificuldade em ser soldado, além de sua resistência mecânica diminuir quando exposto a temperaturas elevadas.

O alumínio é amplamente utilizado pela indústria principalmente em embalagens e alguns tipos de equipamentos, como latas para embalagem de alimentos (refrigerante), tanques e tachos em unidades fabris antigas, tubulações industriais, dentre outras.

3.2. Corrosão e Biocorrosão de Materiais

A escolha dos materiais a serem utilizados na instalação industrial depende, além das características físicas e químicas inerentes a cada processo específico, da sua resistência ao tratamento de sanitização, à facilidade de limpeza e desinfecção, e à resistência ao ataque de micro-organismos (*biofouling*) (Videla, 2003). A resistência de materiais ao ataque de micro-organismos pode ser dividida em dois grupos: à biocorrosão e à biodeterioração. A biocorrosão pode ser definida como sendo um processo complexo de deterioração de metais promovido por micro-organismos (Videla, 2003), e a biodeterioração, como qualquer mudança indesejável nas propriedades de materiais causadas pelas atividades vitais de organismos (Allsopp *et al.*, 2004).

Apesar dos materiais cerâmicos poderem sofrer corrosão, os metais são mais susceptíveis, podendo apresentar grande perda de massa na região corroída. Por esta razão, aspectos relacionados a sua corrosão serão discutidos a seguir.

3.2.1. Corrosão de Metais

A corrosão de um metal é definida como o seu ataque químico ou eletroquímico. O processo químico se realiza na ausência de água, em geral em temperaturas elevadas, pela combinação entre elementos do meio, formando compostos estáveis. O processo eletroquímico é definido como sendo uma reação química em que há transferência de elétrons entre os componentes (por exemplo, entre a liga e o líquido), ocorrendo oxidação no ânodo e redução no cátodo. O fluxo de cargas da região anódica para a catódica pode ser provocado pela existência de um potencial elétrico (pilha eletroquímica) (Videla, 2003).

Os mecanismos do processo de corrosão são baseados na diferença de concentração de oxigênio entre as duas regiões (Videla, 2003). A reação eletroquímica ocorre sobre a liga metálica na região anódica, onde a aeração é menor, como por exemplo, sob uma gota de líquido. Externamente a essa gota, a concentração de oxigênio é maior e a reação catódica ocorre pela redução do oxigênio.

Segundo Ribbe *et al.* (1971), a corrosão de metais pode ocorrer de diferentes formas:

- a) ataque uniforme: corrosão eletroquímica que ocorre ao longo da superfície exposta, deixando com freqüência uma incrustação; é a forma mais comum de corrosão (exemplo: ferrugem);
- b) corrosão galvânica: caracteriza-se pelo acoplamento eletrônico de dois metais (exemplo: cobre e ferro) diferentes quando expostos a eletrólitos, por exemplo, água do mar. Alguns metais são mais susceptíveis à corrosão galvânica, normalmente os metais menos nobres. Algumas medidas podem ser tomadas para reduzir o efeito da corrosão galvânica, dentre elas destacam-se: a seleção de metais que tenham reatividade próxima um do outro; a utilização de maior

área superficial possível do ânodo (metal mais inerte), evitando assim uma menor razão entre os dois metais; e utilização de proteção catódica, ou seja, ligar um terceiro metal (ânodo) aos outros dois utilizados;

- c) corrosão em frestas: corrosão eletroquímica devido à presença de íons na solução de contato. Quanto maior a concentração de íons, maior a corrosão, principalmente onde a solução fica estagnada, nela ocorrendo a falta localizada de oxigênio dissolvido;
- d) corrosão em pites: é uma corrosão localizada, na qual pequenos buracos (pites) são formados, penetrando verticalmente no interior do material. É uma corrosão perigosa, pois é de difícil detecção até que ocorra a falha;
- e) corrosão intergranular: ocorre ao longo dos grãos da liga metálica; para alguns metais em ambientes específicos, normalmente ocorre nas soldas em aço inoxidável. Quando severa, causa perda de resistência e de ductilidade;
- f) lixívia seletiva: ocorre em ligas, quando um dos elementos é removido em maior concentração que o outro (por exemplo a lixiviação do zinco na liga de latão);
- g) erosão/corrosão: combinação entre ataque químico e abrasão mecânica (desgaste) devido ao movimento de um fluido. O tipo de fluido interfere diretamente no comportamento da corrosão. Geralmente, o aumento no fluxo do fluido causa o aumento da taxa de corrosão;
- h) corrosão sob tensão: chamada também de trincamento, ocorre com a ação conjunta de uma tensão de tração e um ambiente corrosivo. Pode ser acelerada pela tensão;
- i) fragilização por hidrogênio: o metal perde, principalmente, duas propriedades quando o hidrogênio atômico entra no material, a ductibilidade e o limite de resistência (ocasionando falhas). Esta corrosão é similar à que ocorre sob tensão;
- j) oxidação: fenômeno de corrosão seca, ou seja, ocorre na ausência de solução aquosa;
- k) corrosão biológica: ocorre pela atividade metabólica de micro-organismos. Esta

atividade pode produzir um meio corrosivo, ou criar pilhas de concentração eletrolítica sobre a superfície, alterar a resistência das películas superficiais, influenciar a velocidade das reações anódicas e catódicas e por fim alterar a composição do meio.

A preparação e a limpeza das superfícies auxiliam a diminuição da corrosão. O tratamento da superfície é de extrema importância nos metais, pois melhora a qualidade do produto final. A limpeza pode ser dividida em diversas etapas. A mais utilizada é o desengraxamento, que consiste na retirada de óleos, gorduras e graxas, frequentemente utilizados na etapa de usinagem e montagem do produto. Tal processo depende da utilização do material e por qual tipo de processamento este irá passar. Para a limpeza propriamente dita podem ser utilizados métodos tradicionais, classificados em: físicos, eletroquímicos e/ou químicos (Videla, 2003), conforme indicado na Tabela 1.

Estes métodos são muito utilizados, principalmente pela relativa facilidade de aplicação e baixo custo. Segundo a *U.S Environmental Protection Agency* (EPA, 2011) os principais métodos de limpeza industriais utilizados atualmente são: jateamento com areia, com gelo seco, hidrojateamento, tratamento ultravioleta e com ozônio, separação por laser e flash de xenônio, dentre outros.

3.2.2. Biocorrosão de Metais

Segundo Videla (2003), a biocorrosão é definida como a corrosão causada por micro-organismos. Seu estudo envolve várias áreas de conhecimento, como a eletroquímica, a microbiologia e os fenômenos de superfície. Na biocorrosão os micro-organismos participam ativamente do processo de corrosão, sem, entretanto, alterar a natureza eletroquímica deste.

Com a modificação da interface metal/solução pelos micro-organismos, pode ocorrer indução, aceleração e/ou inibição da reação de corrosão pelo processo anódico ou catódico (Videla, 2003).

Tabela 1: Classificação dos métodos de limpeza de metais (adaptado de Ribbe *et al.*, 1971).

Método	Características principais	Finalidade
<i>Métodos Físicos</i>		
Mecânicos (limpeza bruta)	tamboreamento, jato de material abrasivo e processo centrífugo	decapagem, redução, eliminação de areia, de pigmentos ou de carvão
Mecânicos (limpeza fina)	lixar, afinar e polir	aplainar e alisar a superfície
Mecânicos e químicos	limpeza manual com pós de dolomita	desengraxamento
<i>Métodos eletroquímicos</i>		
Físico-químicos	desengraxamento com tri ou percloroetileno, com emulsões ou soluções eletrolíticas	eliminação de óleos, graxas, pó, pastas de polir e análogos
Eletroquímicos	limpeza com sais ou soluções alcalinas	decapagem, desengraxamento
<i>Métodos químicos</i>		
Químicos	limpeza com ácidos, bases, sais oxidantes e decapagem	desengraxamento, decapagem e passivação, eliminação de partículas de poeira, metais, óleos, dentre outros

Como já descrito anteriormente, o processo de corrosão é baseado na diferença de concentração de oxigênio. A biocorrosão segue o mesmo processo, ou seja, há diferença de concentração de oxigênio entre a região sob a colônia microbiana (com menor concentração de oxigênio) e a região externa à colônia (catódica). A principal diferença entre os processos inorgânicos e os que envolvem micro-organismos está no fato de que a diferença de concentração de oxigênio na biocorrosão ocorre devido à respiração microbiana. Outras reações catódicas podem ocorrer no processo de biocorrosão, como a redução de hidrogênio e a redução de sulfetos, principalmente

pelo metabolismo das bactérias sulfato redutoras, uma das principais causadoras da biocorrosão.

A influência dos micro-organismos na corrosão se dá devido a algumas características, por exemplo, a velocidade de reprodução dos micro-organismos (a multiplicação celular ocorre em progressão geométrica), a atividade e a flexibilidade metabólica e a distribuição microbiana no ambiente. A corrosão microbiana ocorre não somente em equipamentos industriais produzidos a partir de ligas metálicas, como também em materiais não metálicos, como madeira, rocha, combustíveis, cimento, concreto, dentre outros (Videla, 2003).

O processo de biocorrosão em superfícies metálicas inicia-se imediatamente após o contato do meio líquido com o material (Christensen e Characklis, 1990). Inicialmente ocorre a formação de um filme de moléculas orgânicas que modifica a distribuição das cargas na superfície do sólido, facilitando a adesão dos micro-organismos, através de forças físicas e interações eletrostáticas. Ao mesmo tempo, ocorrem processos inorgânicos na interface superfície/líquido (corrosão). Apesar dos dois processos ocorrerem simultaneamente, eles seguem sentidos opostos, ou seja, a biocorrosão ocorre no sentido do seio do líquido para a superfície, enquanto que a corrosão inorgânica ocorre da superfície para o fluido. A interface metal/solução formada é chamada de bio-eletroquímica.

A interação entre os dois processos pode mudar o comportamento do metal de variadas formas: facilitando a dissolução ou remoção de produtos de corrosão; gerando condições de aeração quando a formação do biofilme não é uniforme; dificultando o transporte de substâncias e mudando os potenciais redox da interface (Videla, 2003).

Os micro-organismos mais diretamente relacionados à biocorrosão são as bactérias oxidantes do enxofre, as bactérias sulfato redutoras, oxidantes do ferro, além de alguns fungos, leveduras e algas (Videla, 2003).

Segundo Videla (2003), o mecanismo de corrosão microbiana pode ocorrer em diversas situações, podendo-se destacar a biodegradação de coberturas protetoras; a indução de pites nas zonas de aderência celular (acidificação); a produção de metabólitos ácidos e metabólitos capazes de causar ruptura de filmes protetores; o

aumento do potencial redox do meio, criando condições favoráveis para a corrosão; a formação de célula de aeração diferencial, pela distribuição não homogênea de depósitos biológicos; o consumo metabólico de inibidores de corrosão e o ataque seletivo em áreas soldadas ou adjacentes.

Desde a década de 80 têm sido estudados os mecanismos de adesão e fixação de culturas puras de alguns micro-organismos sobre superfícies sólidas. Na prática, sabe-se que a biocorrosão e a biodeterioração aumentam quando o biofilme microbiano se instala na superfície dos equipamentos e tubulações.

3.3. Biofilmes

3.3.1. Definição de biofilmes

A microbiologia tradicional, durante anos, estudou e caracterizou as células em suspensão (planctônicas). Estas células foram exaustivamente isoladas, identificadas e avaliadas. Algumas das bactérias planctônicas estudadas têm a capacidade de aderir em diversas superfícies, formando biofilmes (Ceri *et al.*, 2001).

Assim, biofilme microbiano é definido como sendo uma associação de células bacterianas, de fungos e algas, que colonizam uma superfície (material), seja esta superfície biótica ou abiótica (Ceri *et al.*, 2001), inclusa em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (EPS, abreviação do inglês *Extracellular Polymeric Substances*) de aspecto gelatinoso. A composição da EPS pode variar, e esta matriz confere não somente estrutura ao biofilme, como também facilita o arranjo espacial das diferentes espécies que o compõem.

A EPS é composta, principalmente, de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, glicoproteínas e fosfolipídios (Lennox *et al.*, 2006). A EPS é produzida em parte pelas próprias células do biofilme, e em parte por componentes do ambiente, tais como, detritos, proteínas, materiais orgânicos e até mesmo de outros seres vivos que nela se acumulam (Wimpenny *et al.*, 1993).

O biofilme é considerado uma estrutura porosa, devido ao seu sistema de canais

interligados, e é constituído por cerca de 90% de água, ou seja, apenas cerca de 10% da massa seca de um biofilme é formada por micro-organismos (Costerton *et al.*, 1995).

A composição do biofilme depende, basicamente, das condições do ambiente, por exemplo, temperatura composição do meio, pressão, pH, e disponibilidade de oxigênio dissolvido (O'Toole *et al.*, 2000).

Em um biofilme encontram-se, frequentemente, as bactérias como grupo majoritário, principalmente devido à elevada taxa de reprodução, à grande capacidade de adaptação e produção de EPS (Christensen e Characklis, 1990).

3.3.2. Histórico do estudo de biofilmes

Segundo Marques e Manfio (2004), em 1683 Leeuwenhoek descreveu à *Royal Society* suas observações a respeito das placas em seus próprios dentes, e esta foi a primeira referência à formação de biofilmes.

Em 1943, Zobell (apud Costerton *et al.*, 1978) observou pela primeira vez, em um experimento envolvendo uma suspensão celular em uma garrafa de vidro, que as bactérias encontravam-se em maior número depositadas na superfície interna da garrafa do que na suspensão dentro dela. Desta observação de 1943 até meados de 1970, o estudo sobre biofilmes foi escasso.

Durante a década de 70, os estudos foram direcionados à indústria de petróleo, onde os biofilmes indesejáveis são responsáveis por muitos danos nos equipamentos, tais como o entupimento de poços, redução no fluxo em redes de tubulações de distribuição de água, principalmente devido à biocorrosão.

Em 1978, Costerton *et al.* confirmaram as observações de Zobell (1943) (apud Costerton *et al.*, 1978), através de técnicas de microscopia sofisticadas, e a partir de então o conceito de biofilme começou a ser mais difundido e mais atentamente estudado em diversas áreas. Na década de 80, além dos estudos de biofilmes nas áreas médicas e odontológicas, foram publicados estudos sobre a susceptibilidade de biofilmes a antimicrobianos, porém sempre utilizando como inóculos culturas de micro-organismos isoladas e devidamente caracterizadas. A Tabela 2 mostra alguns

problemas associados com a presença de biofilmes em locais susceptíveis a sua formação.

Tabela 2: Locais susceptíveis à formação de biofilmes e seus efeitos adversos (adaptado de Allsopp et al., 2004).

Localização do Biofilme	Efeitos
Dentes	dentes estragados, cáries
Implantes médicos	infecção por micro-organismos resistentes a antibióticos que atacam o material do implante
Trocadores de calor	redução da transferência de calor
Tubulações	redução do fluxo em decorrência de entupimentos parciais e/ou totais
Torres de resfriamento	redução do desempenho, degradação do equipamento
Sistema de distribuição de água	perda da qualidade da água, aumento de custo com o tratamento, risco a saúde
Sondas e sensores	redução da eficiência
Equipamento da indústria de alimentos	fonte de contaminação, degradação dos equipamentos, aumento de custo com limpeza e sanitização
Filtros e telas	perda de eficiência
Indústria petrolífera e oleodutos	entupimento e corrosão
Cascos de navios	aumento do custo com combustível, devido ao aumento de resistência do casco à água
Materiais de construção	redução da durabilidade

Desde então foram também desenvolvidos diversos sistemas para formação de biofilmes *in vitro*. Dentre eles destacam-se: a) o desenvolvimento de biofilmes na superfície de cilindros carreadores; b) a imobilização de células em hidrogéis; c) o

cultivo celular em quimiostatos; d) o uso de fermentador de filme com espessura constante; e) o sistema de reator de fluxo simples; f) o dispositivo de Robbin modificado e; g) o cultivo de células em placas com micropoços, em dispositivos como o sistema MBEC™ (Ceri *et al.*, 2001).

A Tabela 3 mostra algumas características associadas ao uso dos dispositivos citados para a formação de biofilme e a determinação de sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Embora estes dispositivos tenham sido muito usados, são de difícil manuseio, além de serem de alto custo para aplicação freqüente em áreas industriais.

Tabela 3: Comparação entre os dispositivos mais utilizados para a formação de biofilmes (Lucchesi, 2006).

Sistemas	Monitoramento do biofilme em tempo real	Possibilidade de efetuar múltiplos ensaios	Capacidade de produção de biofilme
Cilindros carreadores	não	sim	sim
Hidrogel	não	não	sim
Quimiostato	não	não	sim
Sistema CDFF	não	não	sim
Reator de Fluxo Simples	sim	não	baixa
Dispositivo de Robbin	não	sim	baixa
Sistema MBEC™	não	sim	sim

Em 1995, Costerton *et al.* descreveram a estrutura do biofilme *in vitro* como sendo “torres com formato de cogumelo” com canais de água entre elas (Figura 4). A penetração de substâncias através desta estrutura é dificultada, de forma que os micro-organismos do centro da colônia ficam mais protegidos dos agentes microbicidas do que os micro-organismos da borda. O transporte de massa que ocorre no biofilme é feito por difusão, que é lenta quando comparada à cinética dos bioprocessos microbianos (Xavier, 2002), o que explica em parte a dificuldade no controle de

biofilmes bem estabelecidos pela adição de biocidas.

Em 2006, Lucchesi desenvolveu uma estratégia para o estudo de biofilmes bacterianos de amostras industriais, empregando um sistema de partículas de vidro como suporte para o crescimento de biofilmes *in vitro* a partir de amostras contaminadas de três segmentos industriais diferentes (óleo de corte usado na usinagem de metais, amaciante de roupas e caldo de cana), como alternativa ao dispositivo MBEC™. Tal dispositivo mostrou-se bastante eficiente não só para o desenvolvimento de biofilmes, mas também como instrumento de estudo da susceptibilidade dos micro-organismos testados a variados tipos de biocidas.

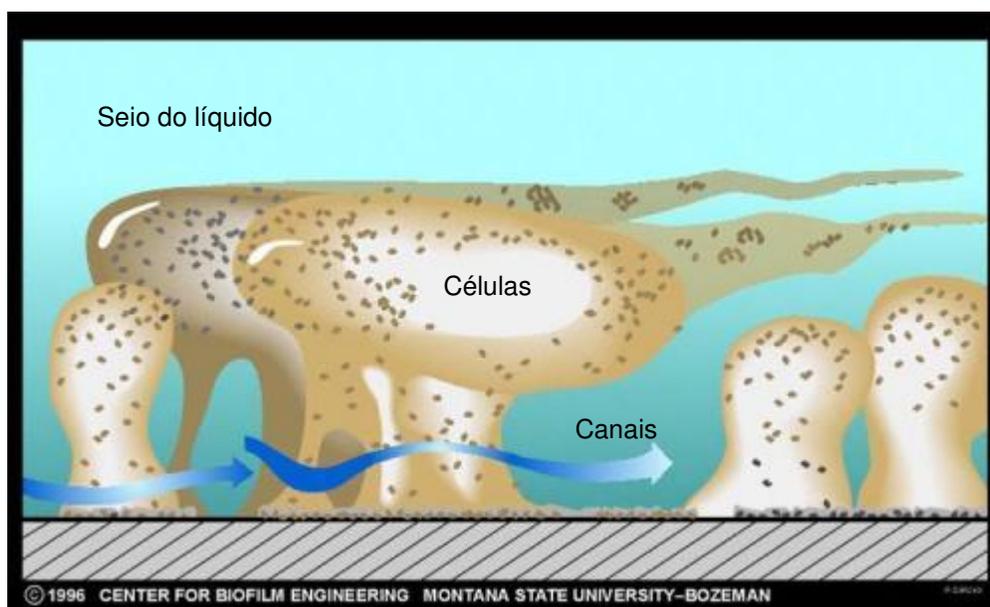


Figura 4: Estrutura do Biofilme (adaptado do Center for Biofilm Engineering, Montana State University, 2011).

Atualmente se estuda a presença, o desenvolvimento, a estrutura, os benefícios (ou não) dos biofilmes em diversas áreas, incluindo o segmento industrial onde sua presença pode acarretar sérios problemas devidos, principalmente, à biocorrosão e entupimentos, acarretando a troca prematura de equipamentos e tubulações e o comprometimento da qualidade final de uma vasta gama de produtos.

3.3.3. Formação dos Biofilmes

A adesão microbiana é um fenômeno que ocorre naturalmente, consistindo em uma estratégia desenvolvida pelos micro-organismos para proteção contra fatores ambientais hostis. Menos de 10% das células bacterianas são encontradas na forma planctônica ou livre (Ceri *et al.*, 1999), por isso verifica-se a predominância numérica e metabólica de células sésseis (aderidas).

Segundo Klemm *et al.* (2010), a formação do biofilme está diretamente relacionada à adesão celular e é resultante de processos biológicos, químicos e físicos que ocorrem simultaneamente. Os fatores que podem iniciar a adesão celular de bactérias Gram-negativas podem estar relacionados ao fato de alguns tipos de células possuírem fímbrias e pili, além de fatores inerentes à sua genética (Tortora *et al.*, 2000). Também estão envolvidas neste processo as cargas das moléculas de superfície da parede celular que podem interagir com as da superfície, a rugosidade e a hidrofobicidade da superfície (Denkhaus *et al.*, 2007 e Zinkevich *et al.*, 2000), além das condições do meio na qual os micro-organismos estão inseridos (Dolan, 2007, Denkhaus *et al.*, 2002 e Fletcher, 1988).

A hidrofobicidade é um dos fatores que favorece a adesão das células a uma superfície, em meio aquoso. O caráter hidrofóbico das superfícies, tanto da célula quanto da superfície de adesão, facilita a remoção do filme de líquido que separa a célula da superfície de adesão, ou seja, a interface célula/líquido e a interface superfície de adesão/líquido serão substituídas pela interface célula/superfície de adesão. Porém a adesão só se concretiza se houver redução da energia livre global (ΔG_{tot}); este fato é explicado pela teoria da termodinâmica (van Loosdrecht *et al.*, 1987 apud Araújo *et al.*, 2010).

Assim, quando a energia livre de interação hidrofóbica é atrativa (ΔG_{tot} negativo) a superfície é considerada hidrofóbica, e quando a energia de interação hidrofóbica é repulsiva (ΔG_{tot} positivo) a superfície é considerada hidrofílica, portanto quanto mais negativo for o ΔG_{tot} , mais hidrofóbica é a superfície (Bayouth *et al.*, 2006 apud Araújo *et al.*, 2010).

A energia livre da interação interfacial entre as moléculas do material imersos na água é a mais apropriada medida da hidrofobicidade. A força de interação hidrofóbica pode apresentar energias potenciais de interação duas vezes superiores às interações de van der Waals (Pashley e Israelachvili, 1984), e pode dar origem a forças de interação importantes na adesão, muitas vezes, se somadas, mais fortes que as interações eletrostáticas (Fletcher e Loeb, 1979; van Looschecht, 1987; Nikawa *et al.*, 1989; Stenstrom, 1989; Azeredo e Oliveira, 2000; Teixeira e Oliveira, 1999). Em alguns estudos verificou-se uma relação direta entre a hidrofobicidade das células e a sua capacidade de adesão a suportes sólidos (Miyake *et al.*, 1986; Stenstrom, 1989; Erner e Douglas, 1992; Panagoda *et al.*, 1998).

Segundo Roosjen *et al.* (2005), os biofilmes se formam em uma grande variedade de superfícies e a taxa de deposição (fixação) microbiana é determinada pelo número de micro-organismos transportados do meio (substrato) para a superfície por unidade de tempo e área, através de sedimentação, difusão e convecção.

O processo de adesão ocorre em duas fases, uma inicial na qual predominam atrações fracas, sendo uma etapa reversível, e a segunda, irreversível, na qual predominam forças físicas e químicas, ocorrendo estabilização pela EPS (Christensen e Characklis, 1990). Durante a adesão, as células modificam seu fenótipo em resposta à aproximação de uma superfície e às condições ambientais, com padrões de crescimento diferentes dos observados nas células livres (Costerton *et al.*, 1987).

Segundo Costerton e Lappin-Scott (1989), o processo de adesão celular a uma superfície inicia-se em decorrência de vários fatores. Dentre eles, destacam-se:

- a) forças de atração e repulsão eletrostática entre as bactérias e a superfície;
- b) interações hidrofóbicas entre a membrana celular e a superfície;
- c) formação de pontes de hidrogênio, que auxiliam a adesão das células ao suporte;
- d) carga da matriz extracelular;
- e) força da gravidade;
- f) movimento Browniano (movimento aleatório e desordenado) das células;

g) afinidade das células pela superfície.

De acordo com Christensen e Characklis (1990), Melo *et al.*, (1994), Vieira (1995) e Pereira e Vieira (2001), dentre os principais fatores que influenciam a formação do biofilme destacam-se:

- a) as espécies planctônicas presentes, pois se um micro-organismo apresentar maior capacidade de formação da EPS, este adere com maior facilidade aos suportes sólidos, definindo as etapas iniciais de adesão e colonização da superfície;
- b) as características do material (composição, porosidade e rugosidade), pois estas condicionam a adesão celular. A rugosidade da superfície pode aumentar a adesão celular, pois os poros protegem as células da turbulência do fluido. Vieira (1995) demonstrou que poros com dimensões de quatro a cinco vezes o comprimento dos micro-organismos facilitam a adesão;
- c) a composição do fluido, o pH, o tipo de suporte e ao substrato disponível. A maioria dos micro-organismos prefere o pH próximo ao neutro para se desenvolver. A variação deste para cima ou para baixo pode afetar o desenvolvimento e a atividade do biofilme, porém não impede que haja proliferação de micro-organismos. Sabe-se que o pH afeta as propriedades elétricas dos micro-organismos e das superfícies, podendo alterar a atração/repulsão eletrostática entre eles.
- d) a presença de cátions metálicos, que são essenciais para o crescimento bacteriano, fixação e formação do biofilme (Klemm *et al.*, 2010).

De acordo com estudos realizados pelo *Center for Biofilm Engineering* (2011), o material da superfície tem pouco ou nenhum efeito sobre o desenvolvimento do biofilme, pois este é formado quase que de maneira igual em vidro, aço, Teflon®, cloreto de polivinila (PVC) e difluoreto de poli vinilideno (PVDF). Porém, os ensaios efetuados por Lucchesi (2006) mostraram que os períodos de maturação do biofilme sobre o vidro e o poliestireno são distintos, e que o biofilme é formado, aparentemente, de maneira similar na superfície destes materiais, porém sua susceptibilidade aos

agentes antimicrobianos é diferente, de forma que a maior ou menor resistência destes biofilmes pode estar diretamente ligada à maturação do biofilme formado.

Xavier (2002) sugere que a estrutura do biofilme pode ser atribuída à sua própria forma tridimensional em conjunto com a distribuição espacial das substâncias nele imobilizadas. As células em biofilmes, além de possuírem a capacidade de fixarem-se a diversas superfícies, podem efetuar comunicação célula-célula, realizada por moléculas de sinalização específica (Vieira, 1995).

Segundo Costerton e Wilson (2004), a formação do biofilme pode, então, ser sumarizada em cinco etapas consecutivas, descritas a seguir e ilustradas na Figura 5.

Na primeira etapa, ocorre adsorção, caracterizada pelo transporte de células livres pelo meio até a superfície sólida, com subsequente fixação dos micro-organismos. Esta etapa é reversível e ocorre dentro de segundos a poucos minutos.

Na segunda etapa, verifica-se a adesão, seguida pelo crescimento e divisão celular. É uma etapa irreversível e ocorre no intervalo de minutos a horas.

Na terceira etapa ocorre a formação de microcolônias. Além da multiplicação celular dos micro-organismos aderidos e a formação da EPS, ocorre a fixação de novas células planctônicas à colônia já existente, pois após a primeira camada de célula (pioneiras) ter se estabelecido, a adesão de outros organismos fica favorecida. Segundo Marshall *et al.* (1971) a fase irreversível da adesão está relacionada diretamente com a EPS produzida.

A quarta etapa é caracterizada pela maturação do biofilme. Nesta etapa há o desenvolvimento e a maturação do biofilme, tanto das estruturas na forma de “cogumelos” quanto dos canais de água.

Finalmente, na quinta e última etapa, verifica-se a liberação de microcolônias que irão colonizar outras superfícies. Dentre os vários mecanismos de liberação pode-se citar:

- a) deslocamento (“*sloughing off*”): ocorre quando grandes porções do biofilme se destacam da colônia, podendo ser ocasionado por alteração de condições dentro do próprio biofilme. Está sempre associado a biofilmes espessos;

- b) erosão: é a perda contínua de porções do biofilme, causada por alterações ambientais, normalmente pela alteração do fluxo de líquido;
- c) abrasão: é a perda de partes do biofilme como resultado das repetidas colisões entre a superfície e partículas sólidas presentes no fluido, ou das partículas com o biofilme;
- d) ataque de predadores (“*grazing*”): perda celular pelo ataque de protozoários que se alimentam da e/ou na superfície dos biofilmes.

A taxa de remoção do biofilme aumenta à medida que este vai se desenvolvendo, e está diretamente relacionada à velocidade de passagem do fluido, que pode favorecer o depósito de partículas e células mais resistentes à ação mecânica, e também promover a sua erosão.

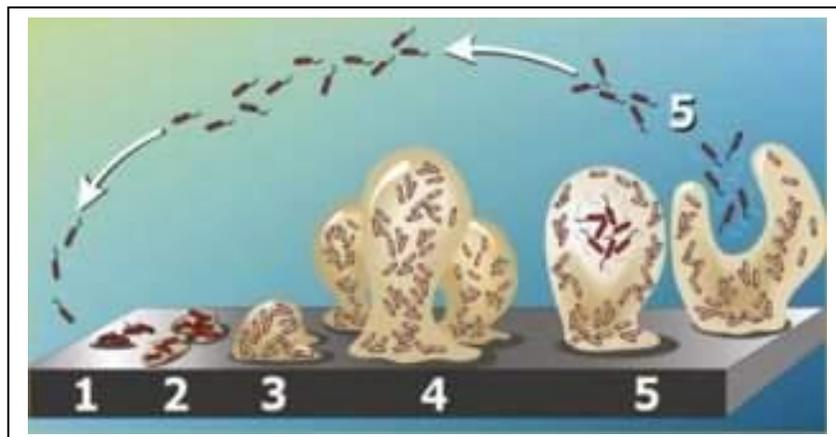


Figura 5: Etapas da formação do biofilme: (1) adsorção; (2) adesão; (3) formação de microcolônias; (4) maturação e (5) liberação (adaptado de Colorado Boulder Applied Mathematical Biology Group, 2011).

Monds e O’Toole (2009) discutiram se recentes estudos sobre formação de biofilmes atendem ao modelo acima citado, pois para estes autores o modelo de formação de biofilmes ainda está em desenvolvimento, já que há a necessidade de validação experimental sobre as causas das alterações morfológicas e estruturais que ocorrem no biofilme durante seu desenvolvimento.

Segundo Mattila-Sandholm e Wirtaner (1992), os gêneros mais comuns de bactérias formadoras de biofilme são: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Alcaligenes*, porém pode-se observar em diversos estudos que os micro-organismos predominantes dependem do habitat onde se desenvolve o biofilme. Pode-se citar, por exemplo, o caso de biofilmes dentais, formados por micro-organismos da microbiota bucal, que podem conter cerca de 500 espécies (Toassi e Petry, 2002). Já nas tubulações de indústria de laticínios predominam as bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (Marshall, 1992; Kasnowski *et al.*, 2010).

Um dos tipos de micro-organismos mais estudados tanto em cultura pura como na forma séssil é a *Pseudomonas aeruginosa*. Atualmente, através do uso de avançadas técnicas moleculares determinou-se, por exemplo, os genes responsáveis pelo controle da motilidade flagelar deste micro-organismo. No entanto não se conhece ainda muito sobre os genes que controlam a estrutura de comunidade ou cooperação da *P. aeruginosa* com outras espécies quando em biofilmes (Costerton e Wilson, 2004).

Estudos realizados em usinas de açúcar e álcool mostram que, ao contrário dos inúmeros dados colhidos na literatura disponível e que enfocam os biofilmes de bactérias Gram negativas, os principais causadores de problemas no segmento sucro-alcooleiro são as bactérias Gram positivas produtoras de goma, principalmente de dextrana (Oliveira *et al.*, 2002). Dentre as poucas referências disponíveis em literatura que fazem menção às bactérias Gram-positivas em biofilmes estão a de Boonaert *et al.* (2001), McBain *et al.* (2003) e de Locatelli *et al.* (2004).

McBain *et al.* (2003) afirmam que bactérias Gram positivas também estão presentes na estrutura dos biofilmes formados predominantemente por bactérias Gram-negativas, e em alguns casos são as principais responsáveis pelo problema gerado. Locatelli *et al.* (2004) estudaram a formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na superfície de lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone, e concluíram que tanto um material quanto o outro apresentaram fixação de biofilmes a partir dos micro-organismos utilizados como inóculo. Boonaert *et al.* (2001) estudaram a adesão de *Lactobacillus lactis* em

poliestireno e vidro, e concluíram que a adesão foi maior no poliestireno do que no vidro.

Como já mencionado anteriormente, a formação do biofilme é uma estratégia vital adotada pelas células para sobreviverem em condições adversas (Sepandj *et al.*, 2003), porém essa associação apresenta vantagens e desvantagens aos micro-organismos que compõem o biofilme.

Dentre as vantagens destacam-se:

- a) a capacidade para estabelecer e colonizar superfícies, principalmente por apresentarem interações de mutualismo, comensalismo, antagonismo e saprofitismo, podendo estas ocorrer entre micro-organismo-micro-organismo ou micro-organismo-organismo multicelular (Lennox *et al.*, 2006);
- b) a possibilidade de troca de material genético, principalmente através de plasmídeos (Lennox *et al.*, 2006);
- c) a proteção contra fatores ambientais hostis como alterações de pH, concentração de sais, substâncias químicas agressivas, predadores, desidratação e agentes antimicrobianos (diminuição da susceptibilidade aos mesmos);
- d) o aumento da concentração de nutrientes na interface líquido-biofilme, já que a EPS facilita sua adsorção.

Como desvantagens pode-se mencionar o desvio do substrato para produção da EPS, ao invés de sua utilização para a proliferação, reduzindo a taxa específica de crescimento e aumentando a resistência ao transporte de substâncias nutrientes para o interior do biofilme e de metabólitos para seu exterior.

Conforme já mencionado, a matriz de EPS é heterogênea e complexa, podendo conter proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), glicoproteínas e fosfolípidios, dentre outros, prevalecendo, segundo Wimpenny *et al.* (1993), os polissacarídeos. Porém, estudos posteriores com *Pseudomonas putida* mostraram que 75% da EPS é constituída por proteínas (Jahn *et al.*, 1999).

Dentre as principais funções da EPS, destaca-se seu papel no estabelecimento

da morfologia, estrutura, integridade funcional e coesão dos biofilmes. Além disso, a EPS determina a maioria das propriedades biológicas, químicas e físicas dos biofilmes (Flemming e Wingender, 1999), e impede ou dificulta o acesso físico (difusão) de certos agentes antimicrobianos para seu interior (Elvers e Lappin-Scott, 2000; Gilbert *et al.*, 2001 e Allison, 2003), além de permitir a adesão a diferentes superfícies (Pérez *et al.*, 2010). A Tabela 4 mostra algumas das funções das substâncias poliméricas extracelulares no biofilme.

Tabela 4: Função dos polímeros extracelulares no biofilme (adaptada de Flemming e Wingender, 2010).

Componente envolvido	Função	Relevância para o Biofilme
Polissacarídeos, proteínas, DNA e moléculas anfifílicas	Adesão	A adesão consiste na primeira etapa de formação do biofilme
Polissacarídeos, proteínas e DNA	Coesão da estrutura	Hidratação do biofilme, determina a estrutura do biofilme, permite a comunicação célula-célula
DNA	Troca de informação genética	Facilita a transferência de genes entre o biofilme e as células
Polissacarídeos e proteínas	Sorção de compostos orgânicos	Acúmulo de nutrientes para o desenvolvimento do biofilme
Polissacarídeos e proteínas	Barreira de proteção	Conferem resistência mecânica e protegem contra agentes antimicrobianos

3.3.4. Controle do Biofilme em Instalações Industriais

Uma vez que todo sistema industrial está sujeito à formação de biofilmes indesejáveis, ações preventivas que possam evitar, controlar ou retardar sua formação são muito importantes, tais como:

- a) elaborar e executar projetos de instalação adequados, evitando zonas mortas e

- pontos de estagnação, e/ou utilizar materiais menos susceptíveis à biocorrosão;
- b) reduzir a concentração de nutrientes nos fluidos em circulação;
 - c) definir e implantar planos sistemáticos de limpeza e sanitização;
 - d) monitorar o crescimento dos biofilmes através de técnicas microbiológicas (como Swab), inspeção visual e de sinais de biocorrosão.

Uma vez instalado o biofilme, sua remoção deve ser efetuada por métodos físicos, químicos ou biológicos. Os métodos físicos consistem em remoção (limpeza) manual ou mecânica, choques térmicos, injeção de ar ou gás e radiação ultravioleta, similarmente aos apresentados na Tabela 1, para a diminuição da ocorrência da corrosão. Os métodos químicos envolvem a adição de agentes antimicrobianos.

Agentes antimicrobianos, também denominados de biocidas, são produtos químicos que contêm princípios ativos capazes de inibir, prevenir o desenvolvimento ou matar os micro-organismos, sendo utilizados, normalmente, a baixas concentrações e em diversos segmentos industriais que envolvem água no processamento de seus produtos (Biocidal Products Directive, 2007).

Os biocidas industriais devem apresentar alguns requisitos básicos para sua aplicação, pois estes afetam não só os micro-organismos-alvo como também outras formas de vida. Assim, de uma forma ou de outra, estes compostos causam impacto no meio ambiente. Dentre estes requisitos, destacam-se: a) possuir amplo espectro de ação; b) apresentar capacidade de permear a membrana celular; c) possuir baixa toxicidade a seres humanos e animais; d) não ser carcinogênico e mutagênico; e) apresentar boa solubilidade e alta dispersão em meio líquido; f) ser de baixo custo; g) possuir eficiência em baixas concentrações; h) ser de fácil manuseio, não inflamável, não irritante e biodegradável; e i) quando atuando em conjunto com outros biocidas, devem apresentar mecanismos de ação diferentes para diminuir a ocorrência de resistência adquirida pelos micro-organismos

É preciso cautela na utilização do biocida para o controle de biofilmes, pois a sub-dosagem pode trazer a falsa sensação de segurança, além de induzir a seleção de micro-organismos mais resistentes e causar surtos de contaminação. Segundo Cloete

(2003), a resistência microbiana pode ser dividida, basicamente, em dois tipos: a primeira é a resistência intrínseca, natural ou inerente, controlada geneticamente e relacionada às características estruturais dos micro-organismos, como a capa de um esporo ou a parede celular. A segunda é chamada de resistência adquirida, geralmente ocorre por mutação cromossômica ou por transferência de material genético através de plasmídeos.

Os biocidas são divididos em dois grandes grupos, os oxidantes, que compreendem principalmente o cloro, o bromo e seus derivados, o peróxido de hidrogênio e o ozônio; e os não oxidantes, que incluem, principalmente, os fenóis, a formalina, o quaternário de amônio, surfatantes e a família das isotiazolinonas.

Os principais alvos dos mecanismos de ação dos biocidas são, normalmente, as paredes celulares externas, a membrana celular e o citoplasma, destacando-se sua ação na síntese de enzimas (Denyer e Stewart,1998). Na Tabela 5 mostra-se a composição de alguns tipos de biocidas mais comumente utilizados, o alvo e os mecanismos de ação destas moléculas sobre os micro-organismos.

Os modos de ação variam de acordo com o tipo de ativo antimicrobiano sendo três os mecanismos mais aceitos (Burk, 1984). De acordo com o primeiro mecanismo, os ativos microbicidas reagem com grupos SH (sulfidril) da membrana celular, havendo alteração no mecanismo da bomba de sódio e potássio e subsequente rompimento da membrana celular, conferindo à célula morte rápida (“fast kill”). O segundo mecanismo prevê a passagem do ativo microbicida através da membrana celular, a reação com componentes das células (lisossomos, mitocôndria, etc) e a modificação do metabolismo celular, ocorrendo assim a morte da célula mais lentamente do pelo primeiro mecanismo. De acordo com o terceiro mecanismo, ocorre a passagem do ativo microbicida através da membrana celular, que reage com o DNA/RNA durante o processo de duplicação celular, impede o processo de duplicação e resultando na morte da célula de maneira lenta (“slow kill”).

Tabela 5: Mecanismos de ação dos principais agentes antimicrobianos (adaptada de Burk, 1984).

Tipo de biocida	Alvo e mecanismo de ação	Vantagem	Desvantagem
Cloro e seus derivados	difusão pela membrana celular, reação química com enzimas citoplasmáticas, oxidando seus sítios ativos	excelente algicida e esporicida de baixo custo	corrosivo
Ozônio	difusão pela membrana celular, inativação de enzimas essenciais à respiração	bom esporicida	alto custo
Glutaraldeído	parede celular, provoca lise e dependendo da concentração, é esterilizante	bactericida, fungicida e esporicida	toxicidade, difícil manuseio
Formaldeído	parede celular, provoca lise	bactericida, fungicida e esporicida	carcinogênico, difícil manuseio
Fenóis clorados	adsorção na parede celular, difusão para o citoplasma, formação de um colóide que precipita proteínas, lise celular	baixo custo, efeito residual prolongado	alta toxicidade e baixa eficiência em pH alcalino
Quaternário de amônio	sítios negativos da parede celular, causa lise, desnatura proteínas da membrana	algicida, bactericida e microbiostático	causa espuma e floculação no sistema
Organossulfurados	remove íon ferro indispensável para a respiração celular	suporta pH alcalino	alta toxicidade
Triazina	parede celular, inativa grupos sulfídricos de enzimas,	bom bactericida, baixo custo	pouco eficaz contra fungos
Isotiazolinonas	interfere na respiração, inativa enzimas, parede celular	além da ação bactericida é bom fungicida.	odor e alta toxicidade

Hoje, tem-se procurado misturas de ativos microbianos com mecanismos de ação diferentes, com associação dos mecanismos de “fast kill” com os de “slow kill” na tentativa de aumentar o espectro de ação do biocida.

Na indústria de usinagem de metais, basicamente, há duas estratégias para a adição de biocidas: tratamento de choque ou pulso e tratamento por adição contínua. Na estratégia de choque, adiciona-se ao sistema uma alta concentração de biocida, normalmente utilizada quando a formação do biofilme é intensa e quando a população de micro-organismos no fluido é muito alta, pois nesta condição o sistema favorece a instalação e desenvolvimento rápido do biofilme (Lutey, 1995). Já a estratégia de alimentação contínua é utilizada em sistemas nos quais se deseja promover o controle do crescimento microbiano. Neste caso, a concentração de biocida é menor, mantendo-se as condições biostáticas no sistema (Willis e Bott, 1997).

3.3.5. Susceptibilidade de Biofilmes e Células Planctônicas a Biocidas

Os ensaios de susceptibilidade de biofilmes industriais a biocidas são pouco abordados na literatura. Isso não significa que o problema seja pouco importante, pois além dos custos envolvidos para manutenção e troca precoce de equipamentos e tubulações, para a indústria descartar ou retrabalhar seu material contaminado/deteriorado é também bastante oneroso. Por isso, acompanhar a evolução e comportamento dos biofilmes, tentando evitar ou minimizar o problema, garantindo vida útil mais prolongada do sistema industrial, é técnica e economicamente viável ao segmento.

Para se verificar a susceptibilidade de células planctônicas a antimicrobianos, comumente utiliza-se o ensaio padrão de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Vanderzant e Splittstoesser, 1992), porém, para biofilmes, este método não fornece resultados confiáveis. Ensaios de susceptibilidade de biofilmes a biocidas efetuados por Ceri *et al.* (1999) mostraram que a concentração de agente ativo necessário para erradicação do biofilme é de 100 a 1.000 vezes maior do que a determinada no CIM. Esta resistência se dá em decorrência da EPS e pela composição da membrana externa e da parede celular, principalmente em bactérias Gram-negativas (Christensen

e Characklis, 1990).

Estudos de susceptibilidade a agentes antimicrobianos de biofilmes formados a partir de inóculos mistos coletados de fluido de corte usado em usinagem de metais mostraram que a concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) foi de 11 a 50 vezes maior que a concentração determinada pelo CIM, indicando a dependência das características dos materiais testados (Lucchesi, 2006).

A susceptibilidade de biofilmes as agentes antimicrobianos está associada, além de à formação de EPS, a modificações fenotípicas que ocorrem nas células que formam o biofilme. Estudos de estratégias para impedir a formação de biofilme ou aumentar sua susceptibilidade a biocidas estão em grande evidência, dentre eles o estudo do processo de comunicação celular inter e intra espécies chamado de *quorum sensing*.

3.4. Quorum Sensing

3.4.1. Definição de Quorum Sensing

Quorum-sensing (percepção de quorum) ou auto-indução é um processo de comunicação intra e interespecies microbianas. Neste processo ocorrem alterações fenotípicas sempre que a densidade populacional é alta (Cha *et al.*, 1998). A descoberta do sistema “*quorum sensing*” (QS) evidenciou que embora as bactérias sejam estrutural e geneticamente simples, tais micro-organismos têm a capacidade de se comportar como organismos multicelulares complexos, que se comunicam e agem de forma coordenada por meio de moléculas auto-indutores (Cha *et al.*, 1998).

Os auto-indutores (AI) são basicamente aminoácidos modificados (lactonas homosserinas) que carregam substituintes variáveis de cadeia acil, sendo denominados N-acil homosserinas lactonas (ALH). Na Figura 6 é mostrada a formula básica de uma homosserina lactona. As bactérias produzem os auto-indutores, que se acumulam progressivamente e facilmente se difundem através da membrana para o meio extracelular. O aumento da concentração destas moléculas depende diretamente, portanto, da densidade populacional (Hardman *et al.*, 1998).

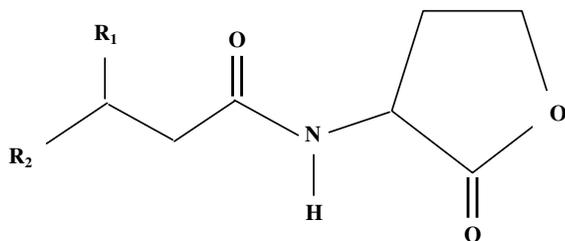


Figura 6: Estrutura geral da homoserina lactona. R₁, -H, -OH ou =O; R₂, -CH₃, -(CH₂)₂-CH₃ ou -(CH₂)₃CH=CH(CH₂)₅CH₃ (adaptada de Leadbetter e Greenberg, 2000).

Durante o crescimento microbiano, todas as células produzem e liberam uma pequena quantidade de auto-indutores. Quando a população se encontra no meio da fase logarítmica ou no início da fase estacionária de crescimento, a quantidade de auto-indutor produzido alcança uma concentração limite, suficiente para disparar o processo de alteração da expressão gênica. Em termos simplificados: os auto-indutores se ligam a proteínas receptoras que são então ativadas, promovendo a ativação da expressão de certos genes, podendo ainda inibir a expressão de outros genes que se encontravam ativos. Assim, o QS é ativado quando a concentração de auto-indutor atinge um nível tal que sua ligação a uma proteína receptora é eficiente, permitindo a ativação transcricional de uma série de genes (Hardman *et al.* 1998).

Desta forma, a transcrição de operons decorrentes da presença de auto-indutores pode resultar na regulação de genes específicos, em resposta a um sinal. Por exemplo, uma única célula de bactéria patogênica pode ter dificuldade em invadir, se instalar e transpor o sistema imunológico do hospedeiro, por isso este patógeno pode retardar a expressão gênica de sua virulência até que a população atinja um número suficiente de células, aumentando sensivelmente suas chances de sucesso (Hardman *et al.* 1998).

O sistema QS, além de regular diversos processos biológicos, tais como bioluminescência, aglomeração, biossíntese de antibióticos, transferência de plasmídeos por conjugação e produção de fator de virulência, também está relacionado

com a liberação de toxinas, formação de placas bacterianas nos dentes (biofilmes), corrosão de cascos submersos de barcos, com o controle de reprodução e formação de esporos, dentre outros (Hardman *et al.* 1998).

Hornby *et al.* (2001), em seus estudo com a leveduras *Candida albicans*, discutiram a importância das moléculas de QS em coordenar o comportamento das células em relação aos seus fatores de virulência. Camilli e Bassler (2006) definem o QS como sendo um sistema que possibilita que, através da síntese de moléculas sinalizadoras (auto indutores), os seres unicelulares (incluindo leveduras) tenham a habilidade de perceber e controlar o tamanho de sua população em um determinado ambiente. Chen e Fink (2006) encontraram evidências de que o sistema QS está relacionado com o brotamento em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Por se tratar de um assunto relativamente recente, há muito que se pesquisar e elucidar sobre o sistema QS, porém sabe-se que é um sistema encontrado em inúmeras espécies de micro-organismos e que sua função depende tanto do ambiente quanto das espécies envolvidas.

3.4.2. Histórico do Estudo do *Quorum Sensing*

O estudo do *quorum-sensing* (QS) pode ser considerado como uma ciência jovem, pois até bem pouco tempo não se imaginava que as bactérias se comunicassem entre si a ponto de alterarem seu comportamento. O QS descreve como cada célula individualmente percebe quantas e quais outras células estão dispostas ao seu redor (Bassler, 2007).

Bassler (2007) relata que os estudos sobre QS iniciaram-se na década de 60, porém somente em 1970 Nealson *et al.* (apud Bassler, 2007) descobriram que a bactéria marinha *Vibrio fischeri*, um simbiote de peixes e cefalópodes, só produzia luz quando a população atingia um determinado número de indivíduos, ou seja, quando a população era pequena não havia bioluminescência. No entanto foi somente em 1981 que Eberhard *et al.* (apud Bassler, 2007) isolaram, caracterizaram e identificaram a molécula responsável pela indução da produção de luz do *Vibrio fischeri*, chamada de

3-oxohexanoil-homoserina lactona.

Em 1983, Engebrecht *et al.* (apud Bassler, 2007) analisaram pela primeira vez os genes de *V. fischeri* envolvidos no sistema QS, e cinco anos mais tarde Dunlap e Greenberg (apud Bassler, 2007) observaram a ativação por auto-indução das moléculas sinalizadoras, as N-acil-lactonas homoserinas.

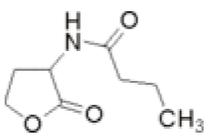
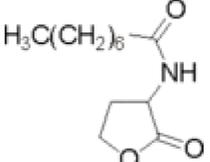
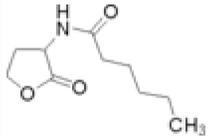
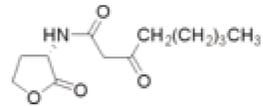
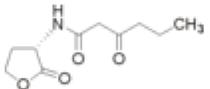
No início da década de 90 descobriu-se que outras bactérias Gram-negativas possuem o sistema QS regulando vários conjuntos de genes (Hardman *et al.*, 1998). A Tabela 6 mostra alguns exemplos de auto-indutores produzidos por bactérias bem como o fenótipo que expressam.

Swift *et al.* (apud Bassler, 2007) em 1993, desenvolveram biossensores para a detecção destas moléculas sinalizadoras, o que poderá ser uma estratégia de grande valia para tentativas de impedir a formação de biofilmes industriais no futuro, sendo que mais recentemente, Bassler (2007) demonstrou mostrou que cada tipo de bactéria, principalmente, as Gram-negativas, produz seu próprio auto-indutor.

Diante do exposto, os biofilmes (grandes responsáveis pela crescente resistência dos micro-organismos a agente antimicrobianos) e os materiais utilizados para construção das áreas industriais ininterruptamente atacados por eles, merecem intensos estudos científicos, visando adequar medidas e ações para impedir/retardar a formação de biofilmes e o desgaste prematuro das instalações, equipamentos e tubulações.

Um dos segmentos industriais mais afetados pela formação dos biofilmes é o de usinagem de metais, conforme discutido a seguir.

Tabela 6: Exemplos de homosserinas lactonas produzidas por micro-organismos e características fenotípicas resultantes de sua expressão (adaptado de Hardman *et al.*, 1998).

Composto	Abreviação (ALH)	Estrutura	Micro-organismos Produtores	Fenótipo expresso
Butanoil-homosserina lactona	C4HSL		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	produção de exoenzimas, cianeto, lectinas, piocianina, pili tipo 4
Octanoil-homosserina lactona	C8HSL		<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Vibrio fischeri</i>	produção de protease
Hexanoil-homosserina lactona	C6HSL		<i>Chromobacteriu violaceum</i>	produção de antibióticos, violaceína, exoenzimas, cianeto
3-oxooctanoil-homosserina lactona	3OC8HSL		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	conjugação celular
3-oxohexanoil-homosserina lactona	3OC6HSL		<i>Erwinia chrysanthemi</i> e <i>Vibrio fischeri</i>	produção de pectinase

3.5. Contaminação microbiológica em fluido de corte

Os fluidos de corte são emulsões com base em óleo e água, na proporção de 5% a 10% de óleo puro, que pode ser de origem vegetal, mineral, sintético ou semi-sintético. O óleo mais utilizado no sistema de usinagem é o semi-sintético (Runge e Durate, 1990). Porém independentemente do óleo utilizado, a emulsão é muito susceptível à contaminação microbiana, pois é rica em nutrientes tais como ácidos graxos, glicóis, outros componentes orgânicos e água, além de fornecer a aeração adequada devido à recirculação da emulsão no sistema (Passman, 1997).

A formulação do fluido de corte é escolhida com base na qualidade do acabamento das peças, na produtividade, no custo operacional e no impacto ambiental. Leva-se ainda em consideração as funções que o fluido de corte deve possuir. Dentre estas funções, pode-se citar a refrigeração, onde o fluido de corte é responsável pela remoção do calor gerado durante o corte, a capacidade de redução do desgaste das ferramentas de corte, a remoção dos cavacos, a proteção de equipamentos e peças contra corrosão, etc (Fogo, 2008).

Assim, as indústrias selecionam o fluido de corte com o melhor balanço custo/benefício, considerando-se os aspectos econômicos das propriedades físicas e químicas desejadas, o tipo de equipamento no qual este será utilizado e principalmente, a facilidade do descarte (Runge, 1990).

O controle da população microbiana tem por objetivo evitar e/ou minimizar a deterioração do fluido, diminuir a formação e o acúmulo de biomassa, além de reduzir o volume de resíduo industrial por evitar a troca da emulsão contaminada (Passman, 1988, 1992 e 1997). A contaminação microbiana causa alterações no fluido de corte e conseqüentemente, interfere em seu desempenho. As alterações causadas pela contaminação que normalmente podem ser notadas são: diminuição do pH, a formação de odores, desestabilização da emulsão, aumento na taxa de corrosão, formação de incrustações (biofilmes), dentre outras (Passman, 1988). Além da observação das alterações das características do fluido, o monitoramento de sua contaminação pode ser efetuado por microscopia direta, microscopia com coloração de Gram, contagem

das unidades formadoras de colônias em meios de culturas ou por um dispositivo de teste rápido que pode ser utilizado na área fabril chamado de laminocultivo, dentre outros meios (Schwingel e Eachus, 2009).

A contaminação microbiana do fluido de corte se dá principalmente por bactérias. Dentre os principais micro-organismos contaminantes do fluido de corte podem-se citar bactérias heterotróficas totais (*Pseudomonas* sp, *Burkholderia*, *Staphylococcus* sp, *Escherichia* sp, *Shigella* sp), bactérias redutoras de sulfato (*Desulfovibrium* sp) e fungos filamentosos (*Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp e *Candida* sp). Bactérias e leveduras predominam no seio do fluido de corte, enquanto que os fungos filamentosos se desenvolvem na área de respingos, nas paredes de equipamentos e em canaletas/calhas (Passman, 1988 e 1992, Runge e Duarte 1990).

O principal motivo para se descartar uma emulsão óleo/água é a contaminação microbiana. Segundo a Brasquip Ambiental, foi registrado o descarte de mais de oito milhões de litros de emulsão óleo/água somente em 2009. Existem diversos meios para se tratar o fluido de corte antes do descarte, os mais utilizados são processos do tipo evaporativo, físico-químico contínuo, físico-químico em batelada, ultra-filtração e termocompressão. O custo estimado para o descarte de uma tonelada do fluido de corte por empresas especializadas no tratamento deste efluente varia entre R\$ 280,00 a R\$ 430,00, dependendo da formulação do fluido de corte e do processo utilizado (Brasquip Ambiental S.A., 2009).

Para o controle da população microbiana dos fluidos existem algumas estratégias, que podem ser de origem química e não química, tais como: pasteurização, filtração, irradiação, sonicação e adição de biocida (Passman, 1992). Dentre as estratégias existentes, a mais comum é a adição de microbicidas, porém estes devem ser devidamente selecionados com base nas legislações nacionais e internacionais, em normas oficiais, no tipo de sistema a ser tratado e na população microbiana inerente ao processo (Passman, 1992).

Segundo Schwingel e Eachus (2009) os ativos microbicidas mais utilizados na usinagem de metais são os liberadores de formaldeído (condensados de formaldeído), dentre eles os derivados de triazina, oxazolidina, bronopol, ativos da família das

isotiazolinonas (principalmente a clorometilisotiazolinona e a metilisotiazolinona), piritionato de sódio. Dentre as triazinas, a mais utilizada é a hexahidro-1,3,5-tris (2-hidroxi-etil)-s- triazina, pois possui uma excelente relação custo/benefício, além de ser estável em condições de pH alcalino e solúvel em água. É formada pela reação entre formaldeído e monoetanolamina (MEA), geralmente formuladas a 80% em água.

Na indústria de usinagem o biocida pode ser utilizado no óleo puro (concentrado) ou na emulsão (fluido), e normalmente em duas estratégias diferentes: preservação (dosagem de manutenção) ou de desinfecção (dosagem de choque). Ambas devem ser efetuadas com critérios para se evitar a subdosagem (que propicia a proliferação de micro-organismos resistentes) ou a supradosagem que além de ser um risco ao meio ambiente e aos operadores, pode aumentar o custo de produção (Runge e Duarte 1990 e Schwingel e Eachus, 2009).

Visto que poucos estudos foram dedicados sistematicamente e especificamente à formação, desenvolvimento, maturação e a susceptibilidade a microbicidas de biofilmes formados em sistema de fluidos de corte (Barr, 1988; Cook e Gaylarde, 1988; Passman, 1988, 1992, 1997 e 2000; Schwingel e Eachus, 2000), no presente trabalho abordou-se este assunto. O estudo efetuado foi desenvolvido com base em um sistema bastante complexo, pois consiste de uma mistura de diferentes tipos celulares (células nativas) em uma mesma emulsão (naturalmente contaminada). Levando em consideração os aspectos já citados, este estudo, propõe não somente verificar o impacto que os materiais de construção têm sobre a fixação dos micro-organismos, mas também avaliar os biofilmes formados nestas superfícies a partir de amostras industriais contaminadas naturalmente e sua susceptibilidade a diferentes agentes microbicidas.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Material

Inóculo para formação dos biofilmes: para efetuar os ensaios de formação de biofilme nas cinco superfícies e testar sua susceptibilidade a biocidas, foi utilizado fluido de corte contaminado (emulsão composta por óleo mineral e água 5% v/v), de uma empresa de usinagem de metais do estado de São Paulo, coletado imediatamente antes do início do estudo. O fluido de corte contaminado foi armazenado em geladeira por todo período em que foi utilizado; semanalmente foi efetuada a quantificação da microbiota, segundo a metodologia descrita no item 4.2.3. Quinzenalmente foi efetuada a adição de emulsão (recém diluída) como fonte de nutriente para manter o inóculo viável.

Meios de cultura: para a quantificação da população microbiana do fluido de corte contaminado, foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), meio Tioglicolato Fluido (FTM), Postgate B (formulado), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Agar Triptona e Soja (TSA) e o Caldo de Triptona e Soja (TSB). Todos os meios de cultura utilizados são da marca DifcoTM e as suas formulações estão apresentadas no Anexo 1. Para neutralização dos microbicidas foi utilizado o Neutralizante D/E marca DifcoTM (formulação no apêndice 1)

Biocidas: A escolha dos antimicrobianos utilizados foi baseada em dados de Lucchesi (2006), em Schwingel e Eachus (2009) e em informações da empresa IPEL – Itibanyl Produtos Especiais LTDA.(Jarinu – SP), empresa fabricante de biocidas, que forneceu os produtos a serem testados, sendo estes:

- a) FBP- 128 - solução sinérgica com base em isotiazolinonas mais semi acetais e tensoativo para compatibilização tanto no óleo puro quanto na emulsão óleo/água.
- b) BNP-115 - solução de bronopol, que é um derivado halogenado, de base aquosa compatível somente com a emulsão óleo/água.

- c) FBP-183 - solução sinérgica de triazina e piritionato de sódio. Este microbicida é compatível com o óleo puro e com a emulsão.
- d) BP-509 - solução contendo isotiazolinonas e bronopol, compatível com a emulsão e com o óleo puro.
- e) BP- 180 - derivado de triazina a 80% em água.

Equipamentos: Para os procedimentos de esterilização de todo o material foi utilizada autoclave vertical com capacidade de 30 litros, da marca FANEM. Uma cabine de biossegurança de fluxo vertical (VECO, modelo VLFS-12) foi utilizada quando necessário, e toda promoção de crescimento bacteriano e de leveduras foi efetuada em estufa incubadora tipo BOD (marca TECNAL modelo 320L) com temperatura controlada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Equipamento idêntico foi utilizado para o desenvolvimento de fungos filamentosos, com temperatura controlada em 25 a 27°C . Um homogeneizador de sangue (marca Phoenix modelo AP-22) foi utilizado para proporcionar o cisalhamento necessário para a formação dos biofilmes na superfície dos materiais na forma de partículas. Para as análises de microscopia, um microscópio óptico binocular (marca Olympus, modelo BH2) foi empregado. Para liberação do biofilme formado na superfície das partículas foi utilizado um sonicador de bancada (marca Thornton, modelo USC1450, 25 khz). Para a caracterização dos corpos de prova quanto à intensidade de brilho foi utilizado o equipamento Micro-TRI-gloss (marca BYK Gardner). Um micrômetro marca Mitutoyo foi utilizado para medir o diâmetro das microesferas. Para a análise da morfologia de superfície através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), empregou-se o microscópio modelo LEO 440i, Leica após a metalização das amostras em mini Sputter coater SC 7620. Para os ensaios de microscopia eletrônica de varredura nas partículas com formação de biofilmes, foram utilizados o PC-Balzers CPD030 Critical Point Dryer para efetuar a secagem das amostras aderidas à superfície dos materiais testados, para o recobrimento das partículas com ouro utilizou-se Balzers SDC05 Sputter Coater, e as imagens foram capturadas no Joel-JSM-58-00LV Scanning Microscope.

Outros Materiais: para a realização dos ensaios foram utilizadas partículas de vidro do tipo U 20 (adquiridas da Só Esferas Comércio de Esferas Ltda, SP), partículas de aço carbono, aço inoxidável e de alumínio (Nacional Esferas Ltda., SP) e partículas de PVC (TRM Resinas Termoplásticas Indústria e Comércio Ltda., SP), com diâmetro médio de 0,91mm a 1,26 mm. A pré-caracterização das partículas quanto à composição foi efetuada pelos fornecedores e estes dados estão descritos na Tabela 7. Alternativamente foram utilizados corpos de prova dos mesmos materiais na forma de lâminas de 7,5 cm x 2,5 cm obtidas dos mesmos fornecedores das partículas.

Tabela 7: Composição das partículas utilizadas segundo seus fabricantes.

Material	Composição
Vidro	81% SiO ₂ 2% Al ₂ O ₃ 4% Na ₂ O 13% B ₂ O ₃
Aço Carbono Comum (AISI-1020)	0,2% C 0,3% Mn 0,04% P 0,05% S 99,41% Fe
Aço Inoxidável (AISI-304)	0,08% C 2,0% Mn 0,75% P 0,03% S 18-20% Cr 8,0-15% Ni 0,10% N 71,04% Fe
Alumínio (1100)	0,25% Si 0,4% Fé 0,05% Cu 0,05% Mn 99-99,5% Al 0,05% Zn 0,03% Ti
PVC	57% Cl 43% eteno

Foram também empregados no decorrer dos ensaios tubos de ensaio com tampa rosqueável nos tamanhos 16 mm x150 mm e 16 mm x100 mm, micropipetas de volume variável de 100 a 1000 µL (Brand), ponteiros descartáveis, curetas de aço inoxidável da marca Edlo nº03 de 30 cm de comprimento, pinças curvas de aço inoxidável de marca Ervinguth e modelo Crile (16 cm de comprimento), placas de Petri de poliestireno estéreis e descartáveis de 9 cm de diâmetro (marca Inlab) e frascos de reagente tipo Schott com capacidades para 250 mL, 500 mL e 1000 mL. Para medir o residual de triazina na emulsão foi utilizado o kit RQ-Flex® (Merck).

4.2. Métodos

4.2.1. Levantamento de dados sobre a distribuição numérica dos tipos de materiais usados em plantas industriais

Devido à escassez de informações a respeito da escolha de materiais nos segmentos industriais, foi efetuada uma pesquisa inicial a fim de auxiliar a seleção dos materiais a serem utilizados neste estudo.

Com a finalidade de definir os tipos de materiais a serem empregados na confecção de amostras a serem utilizadas no estudo de biofilmes, foram selecionadas 400 empresas, de norte a sul do Brasil, para uma pesquisa de frequência de utilização de materiais constituinte de peças, equipamentos e instalações nos seguintes segmentos de mercado: cosméticos (60 empresas), tintas e revestimentos (90 empresas), óleo de corte (70 empresas), domissanitários (40 empresas), polímeros (50 empresas), indústrias de produtos químicos especiais e farmacêuticas (40 empresas) e papel (50 empresas).

Tal pesquisa foi efetuada empregando o questionário indicado no Anexo 2, que aborda também o conhecimento das Boas Práticas de Fabricação. Os dados obtidos no levantamento foram tratados e utilizados como base para a seleção de materiais utilizados no desenvolvimento deste projeto.

4.2.2. Caracterização das superfícies

A caracterização do material de suporte dos biofilmes realizada neste projeto (antes da inoculação dos materiais) cobriu os aspectos de intensidade de brilho, área superficial total, área superficial de microporos, volume de poros e microporos e tamanho dos poros. Foi também analisada sua hidrofobicidade, utilizando os materiais em forma de lâminas, através da medida do ângulo de contato.

Os testes de intensidade de brilho foram realizados na MAST Comercial e Importadora Ltda., com o auxílio do Engenheiro Luis Carlos Bevilaqua empregando o equipamento Micro-TRI-gloss, que mede a reflexão da luz especular, a partir de três ângulos de luz incidente (20°, 60° e 85°) diretamente em uma superfície. Para que as medições pudessem ser comparadas, os medidores de brilho foram padronizados e calibrados. Por ser o ângulo de iluminação de grande influência foram utilizadas as análises em três ângulos diferentes de medição 20°, 60° e 85°. Na Tabela 8 estão indicadas as estratégias de medida (quanto ao ângulo de luz incidente a ser selecionado), tendo por base uma análise preliminar feita a 60° (ASTM D523 – 89, 1999).

Tabela 8: Classificação das superfícies de acordo com sua intensidade de brilho (adaptada da literatura técnica – BYK Gardner, 2006).

Faixa de Brilho	Brilho em análise preliminar a 60° (UB=unidade de brilho)	Ângulo de medida adequado para a medição
Alto Brilho	Maior 70 UB	20°
Semi Brilho	10-70 UB	60°
Baixo Brilho	Menor 10 UB	85°

Os ensaios para determinação da área superficial total, área superficial de micro poros, volume de poros e micro poros e tamanho dos poros foram realizados

empregando os modelos de BET, BJH (dessorção), de DH (dessorção) no Laboratório de Energia e Meio Ambiente (LEMA) da Universidade Metodista de Piracicaba, com suporte técnico do Prof. Dr. Aparecido R. Coutinho, utilizando equipamento de modelo AUTOSORB-1MP, marca QuantaChrome.

A análise do caráter hidrofóbico foi realizada com o medidor de ângulo de contato Tantec, com o suporte técnico do Prof. Dr. João Sinézio de Carvalho Campos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

A morfologia das partículas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) no microscópio modelo LEO 440, Leica (disponível no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp). As partículas foram fixadas no porta-amostra com fita adesiva dupla face de carbono e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 20 nm) em suas superfícies.

4.2.3. Análise da população microbiana do fluido de corte contaminado

Estes ensaios tiveram por objetivo caracterizar o fluido de corte quanto à microbiota e assim, auxiliar na definição dos agentes antimicrobianos mais recomendáveis para o presente estudo.

Uma alíquota de 1 mL do fluido de corte contaminado foi diluída de forma seriada em 9 mL de água destilada estéril, totalizando 8 passagens, o que equivale a uma diluição de 100.000.000 vezes (10^8) da amostra original. Alíquotas das diluições foram plaqueadas pela metodologia de “*pour plate*” em diferentes meios de cultura, selecionados para recuperar diferentes tipos celulares, conforme descrito a seguir:

- TSA: Tryptic Soy Agar com adição 10 ppm do antibiótico cicloheximida (0,001%) para inibição das leveduras e fungos filamentosos, visando a recuperação de bactérias heterotróficas totais. Para a recuperação das bactérias esporuladas foi efetuado um choque térmico antes da diluição seriada. O choque térmico foi efetuado colocando os tubos contendo a amostra em água fervente por 15 minutos, e, em seguida, em um banho

de gelo por 15 minutos;

- EMB: Eosina Azul de Metileno, para a quantificação de bactérias coliformes totais com diferenciação para *Escherichia coli*;
- SDA: Sabouraud Dextrose Agar com adição de 100 ppm do antibiótico cloranfenicol (0,01%) para inibição de bactérias, visando a quantificação de fungos filamentosos e leveduras;
- FTM: Meio Tioglicolato fluido, para a verificação da presença de bactérias anaeróbias totais;
- Postgate B: para averificação de presença de bactérias sulfato redutoras;

As placas de *Petri* obtidas após o plaqueamento nos meios de cultura TSA, EMB e SDS descritos acima foram incubadas à temperatura de 35-37°C por 48 horas, com exceção das contendo SDA para quantificação de fungos filamentosos, pois a temperatura neste caso foi de 27-29°C, com incubação de 3 a 7 dias.

Para detecção das bactérias anaeróbias totais e sulfato redutoras, foi inoculado 1 mL de cada diluição diretamente nos tubos contendo os meios de cultivo líquido. Os resultados foram expressos como “presença” ou “ausência” por turvação no meio TFM após 48 horas de incubação à temperatura de 35-37 °C, e por enegrecimento no meio de Postgate B, após incubação por até 21 dias à temperatura de 35-37 °C.

4.2.4. Formação dos biofilmes na superfície de partículas de diferentes materiais

Este ensaio teve por objetivo formar biofilmes a partir da amostra de óleo de corte naturalmente contaminado na superfície de partículas de diferentes materiais (vidro, aço inoxidável, aço carbono, PVC, alumínio) com o intuito de verificar o seu comportamento nos testes de susceptibilidade a antimicrobianos, assim como diferenças em suas estruturas e população, comparando-se os resultados obtidos entre si, conforme metodologia estabelecida anteriormente (Lucchesi, 2006) e sucintamente descrita a seguir. Os ensaios foram efetuados em triplicata.

Os ensaios de formação de biofilmes a partir do fluido de corte naturalmente

contaminado e a análise de sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos foram direcionados para o crescimento de bactérias heterotróficas totais, pois além destas serem contaminantes constantes de fluidos de corte, apresentam tempo de crescimento e proliferação relativamente curtos quando comparados às leveduras e fungos filamentosos.

Em tubos de ensaio com tampa de rosca (16 mm x 100 mm) foram pesadas e distribuídas em tubos, alíquotas de 0,3 g de partículas de esferas do material suporte (vidro, aço inoxidável, aço carbono, alumínio e PVC). Aos tubos foram adicionados 4,5 mL de fluido de corte contaminado contendo $1,0 \times 10^9$ UFC/mL e 0,5 mL de meio de cultura TSB. Esses tubos foram colocados no sistema projetado para homogeneização de sangue na velocidade de 4 a 5 rotações por minuto, por 72 horas à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após a incubação por tempo variável (de 10 minutos a 72 horas), as partículas foram removidas com auxílio de uma cureta, transferidas para novos tubos de ensaio estéreis, e lavadas por duas vezes com solução salina estéril (0,9% de NaCl em água destilada) para a remoção das células não aderidas.

Para verificação da população bacteriana presente nos biofilmes formados nas superfícies das partículas, amostras de material de cada tubo foram sonicadas com solução salina estéril por 30 minutos. Após a sonicação, em uma alíquota de 1 ml de cada amostra foi efetuada a diluição seriada com posterior plaqueamento em profundidade no meio de cultura TSA.

Como ensaio padrão, para obtenção de dados para comparação, foi utilizada a cultura de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) em meio de cultivo TSB, seguindo a mesma metodologia descrita acima. A *Pseudomonas aeruginosa* foi escolhida por se tratar de um dos contaminantes mais comuns em fluido de corte (Passman 1988 e 1992), pertencente à família das enterobacterias.

Os resultados após um período de incubação de 48 horas foram analisados e expressos em termos de biomassa por grama.

4.2.5. Estudo da adesão microbiana nas diferentes superfícies por microscopia eletrônica de varredura

Estes ensaios visaram verificar a diferença na adesão celular, bem como a estrutura do biofilme formado, a partir de uma mesma população contaminante, nas diferentes superfícies a testadas. Para isso, foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura os biofilmes formados na superfície das partículas dos cinco materiais escolhidos, nos intervalos de tempo de 10 minutos, uma hora, seis horas, 24 horas e 48 horas. O método de fixação do biofilme às partículas utilizado foi descrito por Little *et al.* (1991). O procedimento empregado na análise foi gentilmente indicado pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Os biofilmes foram primeiramente fixados em solução de paraformaldeído (a 4%) e glutaraldeído (a 2,5%) em tampão cacodilato de sódio (a 0,1M) a 4°C por 2 horas. Após a fixação, as amostras passaram por três lavagens em tampão cacodilato (a 0,1M) por 15 minutos cada. Em seguida, as amostras foram tratadas com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato por 15 minutos em geladeira (segunda fixação), e subsequentemente foram realizadas três lavagens com tampão cacodilato por 10 minutos cada. As amostras foram desidratadas em soluções aquosas de álcool em concentrações crescentes (de 10% até 100%), colocadas no Critical Point Dryer CPD 030 (marca Balzers) para total secagem e montadas no porta-amostra (*stub*) para posterior metalização com partículas de ouro em Sputter Emitech K550 25 (marca Balzers) por 4 minutos (camada de aproximadamente 20 nm). Após a metalização, as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (modelo JSM 5800 LV marca JEOL). As formulações das soluções utilizadas estão descritas no Apêndice 3.

4.2.6. Estudo da população microbiana dos biofilmes por eletroforese em gel de gradiente desnaturante

Este ensaio visou verificar e comparar a composição e diversidade da comunidade microbiana que forma os biofilmes nos cinco diferentes materiais

escolhidos para os testes. O protocolo experimental que foi utilizado foi adaptado pela equipe do Laboratório de Genética de Micro-organismos (Universidade de Mogi das Cruzes), coordenada pelo Dr. Welington L. de Araújo.

4.2.6.1. Análise por meio da técnica de PCR-DGGE

Na técnica de PCR-DGGE o DNA extraído diretamente das esferas foi utilizado para amplificação e posterior separação dos amplicons em gel com gradiente desnaturante. Desta maneira, o DNA presente em 0,3 g de partículas de cada material foi extraído com o Kit MOBIO (Power Soil DNA Extraction). A quantidade e a qualidade dos DNAs extraídos foram verificadas em gel de agarose 1% (w/v). A partir deste DNA foram acessados fragmentos de genes para representar a comunidade bacteriana total. Para isso, as reações foram realizadas em volume de 50 μ L, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde e 400 nM de cada primer universal U968 \perp GC e 1387 R (Tabela 9). Estes dois primers apresentam o início e o final do anelamento, ou seja o primer U968 inicia o anelamento na posição 968, enquanto o 1387 R anela na posição 1401 (final), sempre usando como base o gene 16S rRNA de *Escherichia coli*. Dessa forma, o fragmento amplificado vai da posição 968 até a posição 1401.

Para o ensaio foram utilizados 35 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 55°C. O produto da PCR foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (w/v) em tampão TBE 0.5X, com posterior coloração em solução de brometo de etídeo (10 mg.L⁻¹) e visualização sobre luz ultra-violeta.

Os produtos de PCR obtidos com os primers providos do grampo de GC foram submetidos à análise de eletroforese em gradiente desnaturante em equipamento phorU2 system (Ingeny, Goes, Holanda). Para isso os parâmetros das corridas contêm algumas variações para cada grupo microbiano avaliado. Todas as eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida 6.0% (w/v) em tampão TAE 0,5X, e a eletroforese feita a 100V por 16h. As variações ocorrem no gradiente desnaturante, composto pelas concentrações de uréia e formamida.

O DGGE foi realizado com gradiente desnaturante variando de 45 a 65% (onde 100% de desnaturação significa a concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida).

4.2.6.2. Análise estatística

O programa GelCompar II (Applied Maths, Bélgica) foi utilizado para normalização, conversão e comparação das imagens em matrizes de presença/ausência e intensidade de bandas. A normalização e seleção de bandas feita pelo programa foram cuidadosamente avaliadas e correções manuais feitas quando necessárias. A intensidade relativa das bandas foi calculada para cada amostra a posição das bandas e as respectivas intensidades foram exportadas para análises posteriores.

Tabela 9. Primers utilizados nas análises das comunidades microbianas por PCR-DGGE.

Primer	Alvo	Sequência (5'→3')	Referência
1387R	Bactéria	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	Heuer et al., 1997
U968_LGC	Bactéria	CGC CCG GGG AGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G - AA CGC GAA GAA CCT TAC	Heuer et al., 1997

As análises de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando o programa Canoco 4.5 (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda) (ter Braak & Smilauer, 2002). Os dados exportados do programa GelCompar II (contendo posição e intensidade de bandas) foram utilizadas como dados de ocorrência de espécies. Adicionalmente, a correlação dos tratamentos (superfície e época) com a ocorrência das bandas e suas intensidades foram determinadas pela análise multivariada, realizada no software Canoco 4.5. As bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies e suas intensidades relativas consideradas como frequência de ocorrência destas espécies. Inicialmente uma análise de correlação

(DCA) determinou o gradiente de distribuição dos dados, linear ou normal. Esta constatação foi determinante para a definição do melhor modelo matemático a ser aplicado. No caso de distribuição linear, o melhor modelo matemático é a análise de redundância (RDA), enquanto que dados com distribuição normal se adequam melhor à análise de correspondência canônica (CCA).

O teste estatístico de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor p), dos fatores ambientais na distribuição de espécies das amostras.

4.2.7. Determinação da concentração mínima de biocida para a erradicação dos biofilmes formados nos diferentes materiais

O teste de susceptibilidade a agentes antimicrobianos mede a resistência dos micro-organismos aos ativos, e assim permite definir a concentração eficaz dos microbicidas. Para o teste de susceptibilidade foi escolhido o tempo de 48 horas após a inoculação, pois segundo Lucchesi (2006) este é o tempo de maior maturidade do biofilme nas condições dos procedimentos utilizados.

Este ensaio visou determinar as concentrações de biocidas necessárias para a erradicação dos biofilmes formados na superfície das partículas de vidro, aço inoxidável, aço carbono, alumínio e PVC, para posterior comparação de resultados.

Após a formação dos biofilmes, como descrito no item 4.2.4, as partículas de cada tubo foram lavadas com solução salina estéril. Após as lavagens, foram adicionados 2,5 mL de cada um dos cinco biocidas (em concentrações pré-definidas) e 2,5 mL do meio de cultura TSB. Os tubos foram incubados por 24 horas à temperatura de 35 a 37°C. Após a incubação, as partículas foram lavadas com solução salina estéril e transferidas para tubos contendo 5mL de solução salina estéril (diluyente), que foram sonicados por 30 minutos. Imediatamente após a sonicação, uma alíquota de 1 mL foi diluída em série para plaqueamento em profundidade em meio de cultura TSA. A menor concentração na qual não se verificou crescimento de células foi denominada como a concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB). Os ensaios foram

efetuados em triplicata. Para neutralizar os antimicrobianos foi utilizado no primeiro tubo de diluição o Caldo Neutralizante D/E.

As concentrações dos antimicrobianos foram definidas com base na indicação do fabricante dos biocidas (Tabela 10), ou seja, na dosagem normalmente utilizada nas empresas que utilizam o fluido de corte, e com base nos estudos de Ceri *et al.*, (1999) sobre resistência de biofilmes a antimicrobianos. Durante os ensaios foram utilizadas concentrações de antimicrobianos variando de 10 a 150 vezes a normalmente indicada para uso.

Tabela 10: Concentrações de antimicrobianos utilizados nos testes de suscetibilidade dos biofilmes.

Antimicrobiano (Nome comercial)	Concentrações utilizadas (%)			
	Indicada pelo fabricante (conc. de uso) na emulsão óleo/água	10 vezes concentração de uso	50 vezes a concentração de uso	100 vezes a concentração de uso
FBP-128	0,10	1,0	5,0	10,0
BNP-115	0,12	1,2	6,0	12,0
FBP-183	0,10	1,0	5,0	10,0
BP-509	0,15	1,5	7,5	15,0
BP-180	0,10	1,0	5,0	10,0

4.2.8. Determinação da concentração residual mínima de biocida para retardar ou impedir a formação do biofilme em lâminas de diferentes materiais

Estes ensaios visaram determinar o residual de biocida necessário em um sistema que simula a circulação do fluido de corte para retardar ou impedir a formação dos biofilmes nas superfícies de lâminas de 2,5 X 7,5 cm² (corpos de prova) de vidro,

aço inoxidável 304L e aço carbono 1020, de alumínio e de PVC, de geometria mais apropriada para este tipo de ensaio que as partículas esféricas. A estrutura do dispositivo empregado nos ensaios está indicada na Figura 7. Os ensaios foram divididos em três etapas, sendo a primeira o Teste Padrão (TP), que teve como objetivo verificar a formação de biofilmes mistos nas cinco superfícies em um sistema com a emulsão óleo/água sem adição de biocida. A segunda etapa visou à determinação do residual mínimo de biocida necessário para retardar ou impedir a formação e proliferação de biofilmes nas cinco superfícies testadas; para este fim, utilizou-se a concentração de 0,1% do microbicida BP-180 (solução de 80% de triazina). A terceira etapa teve o mesmo objetivo da segunda, porém neste procedimento utilizou-se o microbicida BP-180 a 0,2%.



Figura 7: Dispositivo para formação de biofilmes em lâminas.

Os corpos de prova foram acondicionados e submersos dentro de uma caixa de vidro de dimensões 45 cm de comprimento por 30 cm de altura por 24 cm profundidade contendo 20 litros de óleo de corte contaminado com recirculação contínua do fluido a um fluxo de 5 L/h. A recirculação foi propiciada pela utilização de bomba submersa de aquário modelo SB 50 (Sarlo Better), com vazão de recirculação de 4,5 litros por hora. A cada 24 horas foi adicionado 1,5% do volume inicial de emulsão óleo/água fresca contendo BP-180 (Biocida 5, triazina), de forma a levar a concentração do biocida a 0,1% ou 0,2% no tanque, sendo estas concentrações adicionadas em relação ao volume total de emulsão do tanque (20 litros), ou seja, possibilitando o ajuste,

respectivamente a 800 ppm ou 1600 ppm de residual de ativo microbicida puro referente ao total da emulsão (20 litros). Tanto o volume de reposição, o biocida utilizado, quanto a concentração de microbicida foram estabelecidos com base no histórico da empresa que forneceu o fluido de corte contaminado. Segundo a empresa a taxa de reposição de fluido de corte fresco é de 1% a 2%, com adição do microbicida nas proporções de 0,1% a 0,2% dependendo do pH da emulsão contaminada. Assim, a população microbiana no seio do líquido deveria permanecer viável, porém controlada para evitar a adesão e a formação do biofilme.

O residual estimado de triazina do BP-180 foi medido a cada 2 dias por 16 dias, utilizando-se o procedimento empregado na IPEL – Itibanyl Produtos Especiais Ltda. A cada período especificado, uma alíquota de 25 mL da fase líquida foi coletada, sendo que cada amostra foi acidificada com solução a 3% de ácido sulfúrico até pH inferior a 4. Completou-se o volume para 50 mL, agitou-se, transferiu-se 10 mL desta solução para uma proveta, completando-se o volume para 100 mL com água destilada. Em 5 mL desta amostra foram adicionadas 10 gotas do reagente F01 (hidróxido de sódio a 10%). Após agitação, uma fita do kit RQ-Flex® foi embebida na amostra e colocada no equipamento RQ-Flex®. O Kit RQflex® tem por base a análise colorimétrica realizada em fitas de reação. O valor determinado no equipamento é comparado a uma curva de calibração, determinando-se a concentração de formaldeído liberada pelo composto triazina presente em cada amostra.

No período de 1 a 15 dias após o início do ensaio, os corpos de prova de cada material (em triplicata) foram retirados, lavados com solução salina, colocados em um frasco contendo 10 mL de água destilada estéril e levados à sonicação por 30 minutos. Após o período de sonicação, uma alíquota de 1 ml foi retirada de cada um dos frascos, diluída em série (1:10) e plaqueada em profundidade em meio de cultura TSA. Após incubação por 48 horas a 35 a 37°C, as placas contendo de 30 a 250 colônias foram contadas para verificação da população aderida em cada corpo de prova.

Foi também efetuada a quantificação da população de bactérias em suspensão no fluido de corte nos mesmos intervalos de análise empregados para cada corpo de prova. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata.

4.2.9. Determinação da concentração de choque necessária para erradicar o biofilme formado na superfície dos corpos de prova

Visando o conceito de alternância de ativo, onde infere-se que a resistência dos micro-organismos aos agentes microbicidas diminui modificando-se, esporadicamente, os ativos antimicrobianos, as dosagens de choque, geralmente, são efetuadas com produtos diferentes do utilizado diariamente. No caso da empresa envolvida no presente estudo, para o tratamento de choque os biocidas BP-509 (Biocida 4) e FBP-128 (Biocida 1) são comumente empregados.

Para este ensaio foi utilizado o sistema descrito no item 4.2.8. Ao fluido de corte em recirculação com população microbiana de 10^7 UFC/mL, foram adicionados 0,20% (v/v) do BP-509 e 0,2% do FBP-128 a cada 24 horas por três dias consecutivos. Após 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 12 horas e 24 horas de cada adição, foram retiradas amostras do fluido de corte (emulsão), para verificação da população microbiana pelo método de diluição seriada e plaqueamento de profundidade em meio de cultura TSA. Não foram efetuados plaqueamentos nos demais meios de cultura, pois para este procedimento o interesse era a recuperação da população de bactérias heterotróficas totais.

As lâminas utilizadas no ensaio foram retiradas do fluido nos mesmos tempos que as amostras líquidas, para verificação de formação de biofilmes nas superfícies.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos. Os dados numéricos dos gráficos aqui apresentados estão disponíveis no Apêndice 4.

5.1. Levantamento de dados sobre a distribuição de tipos de materiais usados em plantas industriais e procedimentos operacionais

Os resultados obtidos com o questionário enviado às empresas de diversos segmentos de mercado propiciaram a escolha dos materiais a serem utilizados neste estudo, assim como a averiguação do conhecimento das Boas Práticas de Fabricação pelos devidos responsáveis por este campo/setor.

Dentre as empresas que receberam o questionário, apenas 118 responderam, representando 29,5% do total de empresas selecionadas (400), sendo que estas respostas foram obtidas de diferentes segmentos industriais, totalizando individualmente: 15 empresas do ramo de domissanitários (12,7%), 12 de cosméticos (10,2%), 5 de polímeros (4,2%), 9 das áreas farmacêuticas e de químicos especiais (7,6%), 40 empresas de tintas e revestimentos (33,9%), 14 de papel e celulose (11,9%) e 23 de óleo de corte (19,4%).

Embora não seja uma porcentagem muito expressiva, foi possível analisar as respostas de acordo com o segmento industrial, ou seja, mediante o tipo de produto acabado de cada empresa, notando-se variações na frequência de uso dos materiais mais utilizados para a confecção de equipamentos, tubulações e instalações, sendo estes materiais alumínio, aço carbono, aço inoxidável, PVC e vidro, como mostra a Figura 8.

Verificou-se que o aço inoxidável é o mais utilizado pela grande maioria das indústrias, o que pode ser explicado por sua alta resistência mecânica, maior resistência à corrosão e à relativa facilidade de limpeza e sanitização, conferindo uma vida útil mais longa aos equipamentos (Runge e Duarte, 1990, Tebecherani, 2011).

Por outro lado, o aço carbono foi o material apontado como o mais utilizado no segmento de óleo de corte quando comparado aos demais segmentos pesquisado. De acordo com as respostas recebidas, esse material pode ser o mais utilizado neste segmento por possuir o menor custo, embora seja o mais susceptível à corrosão (Runge e Duarte, 1990 ; Callister, 2002).

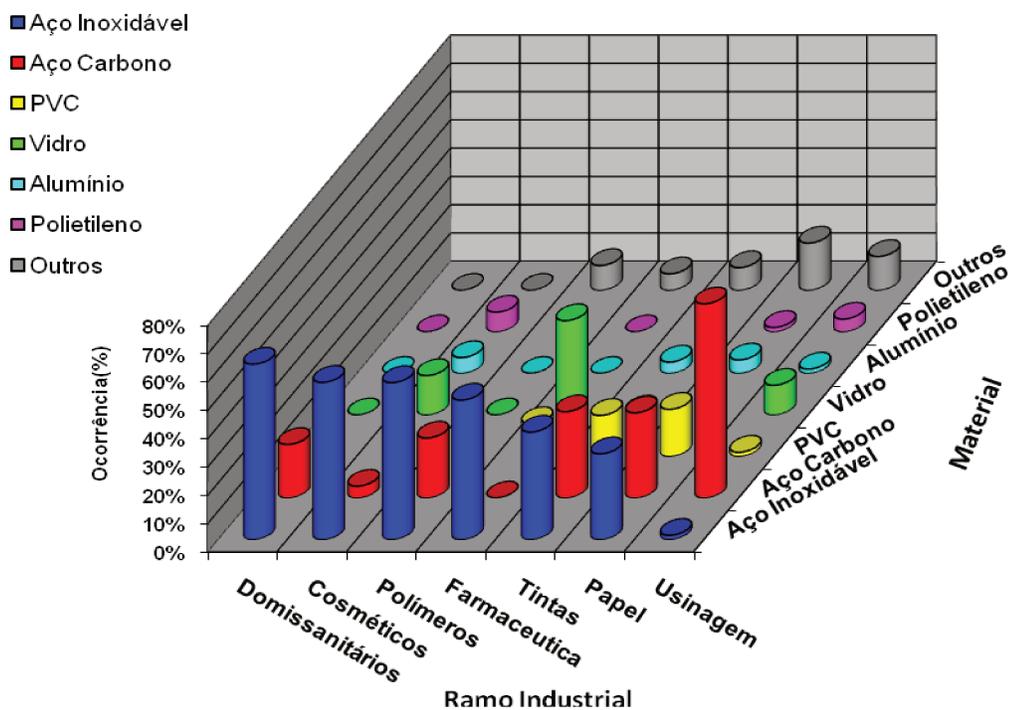


Figura 8: Distribuição dos materiais nos sete segmentos industriais pesquisados.

Nos segmentos de indústrias farmacêuticas e de produtos químicos especiais, o vidro foi o material mais utilizado para a confecção de reatores e tanques, devido principalmente à facilidade de limpeza e à sua baixa capacidade de troca iônica, impedindo contaminações químicas cruzadas (ABIVIDRO, 2010). Entretanto, seu uso é limitado a processos envolvendo baixa capacidade volumétrica, em função de sua reduzida resistência a esforços mecânicos.

Com base na investigação acima citada, dos sete materiais utilizados pelas empresas, cinco foram escolhidos para o estudo proposto: aço inoxidável, aço carbono, alumínio, vidro e PVC. Ressalta-se que embora o PVC seja pouco empregado nos processos que envolvem óleo de corte (Figura 8), ele foi incluído no estudo por se

saber que o mesmo é utilizado com freqüência em outros ramos industriais, pois as tubulações e conexões de PVC são de baixo custo e de fácil substituição quando necessário (Instituto do PVC, 2011).

Analisando-se o nível de conhecimento dos pontos críticos da área fabril e o plano de limpeza e sanitização, como demonstrado na Figura 9, observa-se que as indústrias em geral desconhecem ou ignoram os problemas de corrosão decorrentes de contaminação microbiológica, com exceção dos segmentos farmacêuticos, cosméticos e da indústria papelreira. Estes três segmentos, aparentemente, preocupam-se não só com a limpeza e sanitização de equipamentos, tubulações e superfícies, como também com a utilização de materiais menos susceptíveis à corrosão e à biocorrosão.

Esta conscientização parece ser, em grande parte, fruto do rigor imposto pelos órgãos e entidades que os fiscalizam do que pelo real conhecimento da abrangência dos impactos econômicos, ecológicos e de segurança, que um plano de monitoramento e controle microbiológico adequados dos equipamentos e das áreas fabris podem trazer.

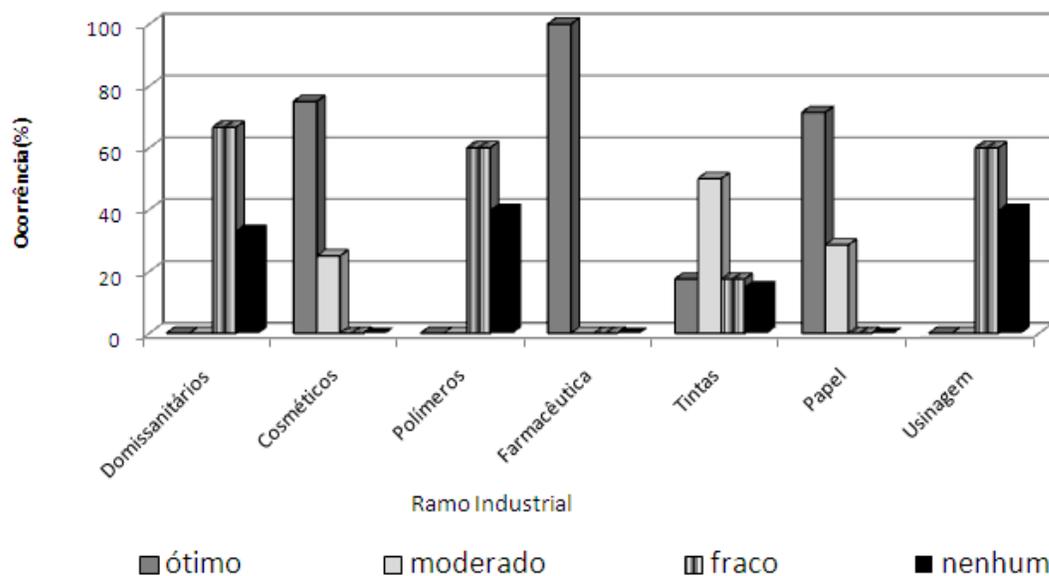


Figura 9: Nível de conhecimento dos pontos críticos da área fabril nos 7 segmentos industriais avaliados na pesquisa por questionário.

Em três dos sete segmentos pesquisados (polímeros, domissanitários e de tintas e revestimentos), pode se observar que os responsáveis pelo projeto inicial e pelo funcionamento dessas indústrias não possuem conhecimento nem experiência necessários para correlacionar os problemas de corrosão com a contaminação microbiológica, indicando a fragilidade do sistema e da capacitação do colaborador, além da falta de conscientização no tocante à gestão de contaminação industrial. O conceito de plano de limpeza e sanitização, que impediria ou dificultaria a formação de biofilmes resistentes em equipamentos e tubulações, está sendo incorporado aos poucos, através de capacitação/programas de treinamento/pesquisa contínua que vêm sendo implantados nas indústrias (Passman, 1992; 1997).

Mesmo com as ações acima citadas, cerca de 30% das empresas responderam que realizam paradas para limpeza e sanitização da instalação somente quando o produto final apresenta contaminação em níveis indesejados.

Uma característica marcante observada no segmento de papel foi o seu perfil comportamental diferenciado frente aos demais segmentos. Neste, os cuidados com a limpeza e controle da contaminação não se devem exclusivamente ao conhecimento, mas sim pela necessidade prática, uma vez que a presença de biofilmes causa a quebra da lâmina de papel durante a fabricação, confere manchas ao produto final, causando prejuízos para a empresa. Na indústria de papel, ao final de cada turno, é efetuado o enxágue dos equipamentos envolvidos no processo de fabricação. E a cada seis meses, é realizada uma parada adicional para uma limpeza completa da linha fabril, denominado de “boil out”.

Com relação aos principais pontos críticos de contaminação microbiana nas indústrias, a grande maioria (77%) respondeu que são equipamentos, tubulações e pontos mortos. No entanto, somente 38,98% das empresas pesquisadas possuem um plano de limpeza e sanitização, segundo mostra a Figura 10.

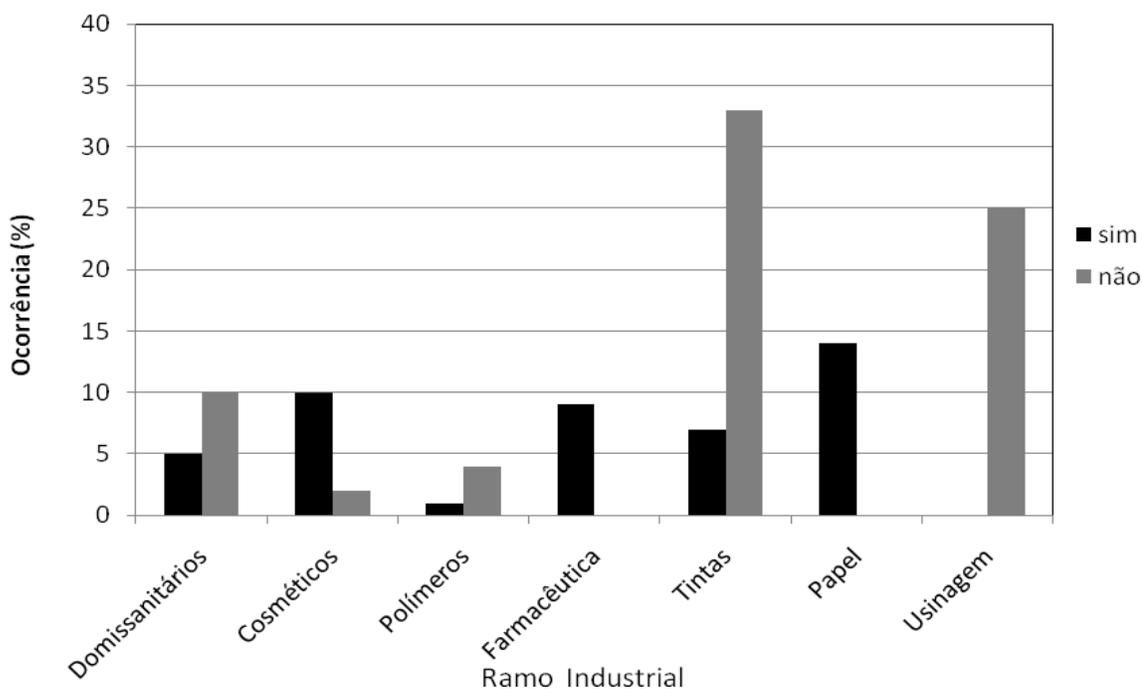


Figura 10: Cronograma e procedimento de limpeza e sanitização industrial.

5.2. Caracterização das superfícies utilizadas no desenvolvimento deste trabalho

Os materiais empregados no presente trabalho foram fornecidos pré-caracterizados pelas empresas quanto à sua composição, conforme apresentados no item 4.1. Os materiais foram então analisados quanto à intensidade de brilho, ao diâmetro médio das partículas, à sua área superficial total, ao volume e tamanho de poros, morfologia e ângulo de contato, sendo os resultados discutidos a seguir.

O brilho de uma superfície é uma impressão visual, por isso, quanto maior a quantidade de luz refletida diretamente, mais evidente será a impressão de brilho. A medida da intensidade de luz refletida no presente estudo foi importante para correlacionar o material com os resultados de formação do biofilme, em decorrência do polimento e, conseqüentemente, da rugosidade superficial. Em tese, quanto mais lisa a superfície, maior é a dificuldade de adesão microbiana sobre o material.

Quando a luz incidente reflete diretamente sobre a superfície, ou seja, quando o

ângulo de incidência é igual ou muito próximo ao ângulo de reflexão, define-se esta superfície como de alto brilho. Quando a luz incidente se dispersa em variadas direções ao ser refletida, ou seja, quanto mais uniformemente se dispersar esta luz, menos intensa é a reflexão na direção principal, indicando que o material é fosco.

A Tabela 11 expressa a classificação dos materiais testados de acordo com a intensidade de brilho, medida em distintos ângulos de medição.

Tabela 11: Resultados da classificação dos materiais testados de acordo com a intensidade de brilho.

Materiais	Intensidade de Brilho nos Diferentes Ângulos (UB)		
	20°	60°	85°
Aço Inoxidável	377,0	352,0	110,0
Vidro	170,0	156,0	120,0
Alumínio	113,0	382,0	127,0
PVC	79,3	88,3	95,1
Aço Carbono	1,3	8,5	15,8

Segundo o fabricante do equipamento Micro-TRI-gloss, a intensidade de brilho deve ser medida nos três ângulos (20°, 60° e 85°); isto é necessário para se obter uma clara diferenciação entre o alto brilho e o fosco. Para valores inferiores a 10, no ângulo de 60°, deve-se utilizar a medida do ângulo de 85°, este valor de ângulo é ideal para medir materiais considerados de baixo brilho (fosco). Se os valores encontrados estão acima de 70 na medida efetuada no ângulo de 60°, o material é considerado de alto brilho e o valor a ser considerado deve ser o encontrado na medição do ângulo de 20°.

Os resultados da intensidade de brilho nas amostras testadas mostraram o aço inoxidável, o vidro, o alumínio como sendo de alto brilho, o PVC com nível de brilho intermediário e o aço carbono como de baixo brilho (fosco). Vale salientar que o vidro foi colocado em uma superfície inerte totalmente preta, que absorve a luz, para

minimizar erros de análise.

O diâmetro médio das partículas de alumínio, aço carbono, aço inoxidável, PVC e vidro foi analisado tomando-se por base as medidas individuais de 100 partículas, para cada um dos cinco materiais escolhidos. Os resultados encontram-se na Tabela 12, juntamente com os valores médios dos volumes específicos e da área superficial específica, considerando que as partículas não apresentassem poros em sua superfície.

Tabela 12: Diâmetro médio, massa das amostras analisadas, área superficial específica média e volume específico médio de partículas dos diferentes tipos de materiais.

Material	Massa de 100 partículas	Diâmetro médio (mm)	Área superficial específica média (mm ² /g)	Volume específico médio (mm ³ /g)
Vidro	0,108	0,91	2408,84	365,54
Aço Carbono	0,396	0,98	761,92	124,45
Aço Inoxidável	0,460	1,03	724,55	124,38
PVC	0,150	1,26	3325,06	698,26
Alumínio	0,155	1,01	2067,57	348,04

Se as partículas não fossem porosas, o material com maior área disponível por grama de amostra para a formação de biofilmes seria o PVC, seguida do vidro, do alumínio, do aço carbono e do aço inoxidável.

A área superficial total, o volume e tamanho dos poros dos materiais utilizados neste estudo foram também analisados pelos modelos de BET, BJH e DH. Os resultados encontram-se descritos, respectivamente, nas Tabelas 13, 14 e 15, para as amostras de vidro, aço carbono e alumínio. Não foi possível obter resultados para as partículas de aço inoxidável e PVC por estes procedimentos de análises, pois as medidas ficaram abaixo do limite de detecção do equipamento utilizado.

Na Tabela 13 notam-se diferenças significativas de valores das áreas superficiais totais das partículas de vidro entre os três modelos. Devido a esta variação e como o modelo BET de medição é um dos mais utilizados, os valores destes resultados foram escolhidos para análise dos materiais testados. Nota-se, entretanto, que qualitativamente os três modelos indicam os mesmos resultados: a área superficial total do aço carbono foi a menor, seguida do alumínio, e o vidro mostrou ter a maior área superficial, sendo esta quase nove vezes maior que a do alumínio pelo modelo BET.

Tabela 13: Resultados das áreas superficiais específicas totais determinadas pelos modelos de BET, BJH e DH.

Modelo	Área Superficial (m ² /g)				
	Vidro	Aço Carbono	Alumínio	Aço inoxidável	PVC
BET	39,58	0,130	4,41	-	-
BJH	45,94	0,223	3,96	-	-
DH	17,50	0,249	4,10	-	-

Entretanto, para se verificar o volume de poros o modelo mais utilizado é o BJH. Este modelo assume que todos os poros são de forma cilíndrica, enquanto que o modelo de DH considera que os poros são de forma cilíndrica ou de fenda. Pelos dados obtidos, demonstrados na Tabela 14, verificou-se que não há diferença significativa entre os resultados encontrados através dos dois modelos, para os materiais testados.

Por outro lado, analisando os dados encontrados pelo modelo BJH, observa-se que o aço carbono possui o menor volume de poros entre as três amostras, enquanto que o vidro possui o maior volume.

Tabela 14: Resultados dos volumes específicos de poros determinados por saturação dos poros, pelos modelos BJH e DH.

Método de Determinação	Volume de poros (cm ³ /g)				
	Vidro	Aço Carbono	Alumínio	Aço inoxidável	PVC
Saturação dos poros	$3,45 \times 10^{-2}$	$4,34 \times 10^{-4}$	$3,94 \times 10^{-3}$	-	-
Modelo BJH	$4,53 \times 10^{-2}$	$5,06 \times 10^{-4}$	$4,71 \times 10^{-3}$	-	-
Modelo DH	$4,46 \times 10^{-2}$	$5,01 \times 10^{-4}$	$4,62 \times 10^{-3}$	-	-

Na Tabela 15 estão apresentados os dados de tamanhos médios de poros de cada material testado, exceto para as partículas de aço inoxidável e PVC, para as quais não foi possível verificar o tamanho dos poros devido ao limite de detecção do equipamento, que está entre 1 e 400 nm.

Tabela 15: Resultados dos diâmetros médios de poros determinados por saturação dos poros (média) e pelos modelos BJH e DH (valor modal).

Modelo	Diâmetro médio de poros (nm)				
	Vidro	Aço Carbono	Alumínio	Aço inoxidável	PVC
Saturação dos poros	349,5	134,3	357,5	< 1	< 1
Modelo BJH	234,0	197,6	384,1	< 1	< 1
Modelo DH	234,0	197,6	384,1	< 1	< 1

Analisando a Tabela 15, os dados encontrados através de todos os modelos mostram que o alumínio apresenta poros maiores que as amostras de vidro, que por sua vez tem poros maiores que o de aço carbono. Sendo assim, teoricamente, o

alumínio seria mais susceptível à adesão de micro-organismos que os demais materiais, devido aos tamanhos de poros que acondicionariam com mais rapidez e facilidade as células planctônicas no seio do fluido. A diferença entre os valores encontrados é decorrente dos modelos utilizados. No modelo de saturação dos poros a medida é efetuada na pressão de saturação do nitrogênio a 77K. A quantidade adsorvida deste gás é, basicamente, o que condensa na superfície de todas as partículas e nos espaços vazios entre as partículas do porta-amostra. Os modelos DH e BJH consideram somente a condensação nos capilares, ou seja, não consideram a condensação entre as partículas. Uma vez que se tem interesse somente nos poros das partículas em si, foram considerados somente os resultados dos modelos DH e BJH. Assim, pode-se concluir que as amostras de vidro, aço carbono e alumínio apresentaram comportamento típico de material de baixa porosidade, caracterizado pela presença predominante de macroporos em sua estrutura.

Para as amostras de aço inoxidável e PVC, devido a sua provável baixa densidade de poros, mesmo utilizando-se o máximo de partículas em cada porta-amostra, não foi possível obter medidas significativas de adsorção.

Correlacionando os dados encontrados quanto ao tamanho e volume de poros com a intensidade de brilho de cada material, o vidro seria o material com a superfície mais susceptível à fixação e proliferação de biofilmes, pois apresenta alto brilho, maior área superficial total e maior volume de poros. O aço carbono foi o material que apresentou menos características apropriadas de superfície para a fixação dos micro-organismos, desconsiderando-se o aço inoxidável e o PVC, por não ter sido possível analisá-los pelos modelos de adsorção de gases empregado.

Estes resultados podem ser contrastados com os observados pela análise de microscopia eletrônica de varredura. Constatou-se que o volume dos poros da amostra de vidro é maior (Tabela 14), porém o mesmo não se aplica ao tamanho de seus poros (Tabela 15 e Figura 11). Os maiores tamanhos de poros foram observados para o alumínio (Tabela 15), provavelmente devido à maior irregularidade da superfície das partículas, como mostra a Figura 12. O aço carbono apresentou menor área superficial total e menor tamanho médio de poros e irregularidades na superfície das partículas que o alumínio (Figuras 12 e 13), mas não inferiores ao PVC e ao aço inoxidável.

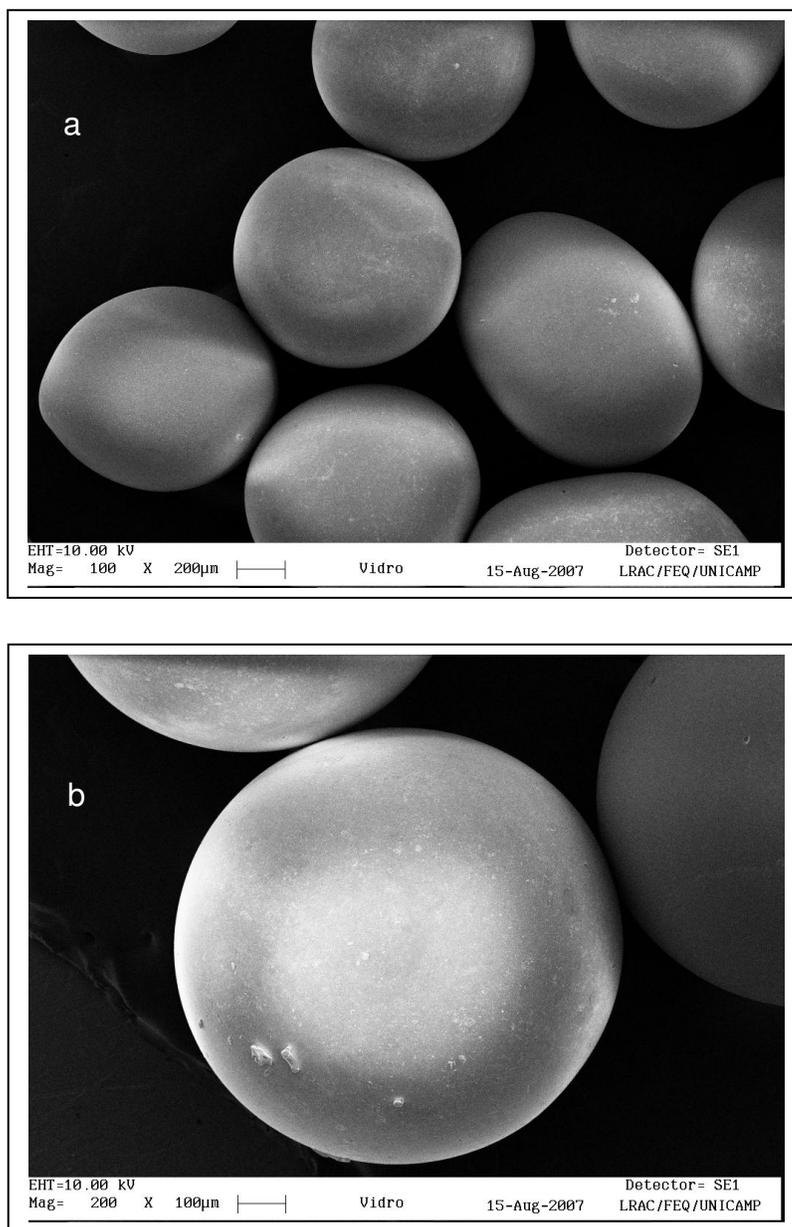


Figura 11: Morfologia da superfície das partículas de vidro analisada por MEV em aumentos de: a) 100 vezes; b) 200 vezes.

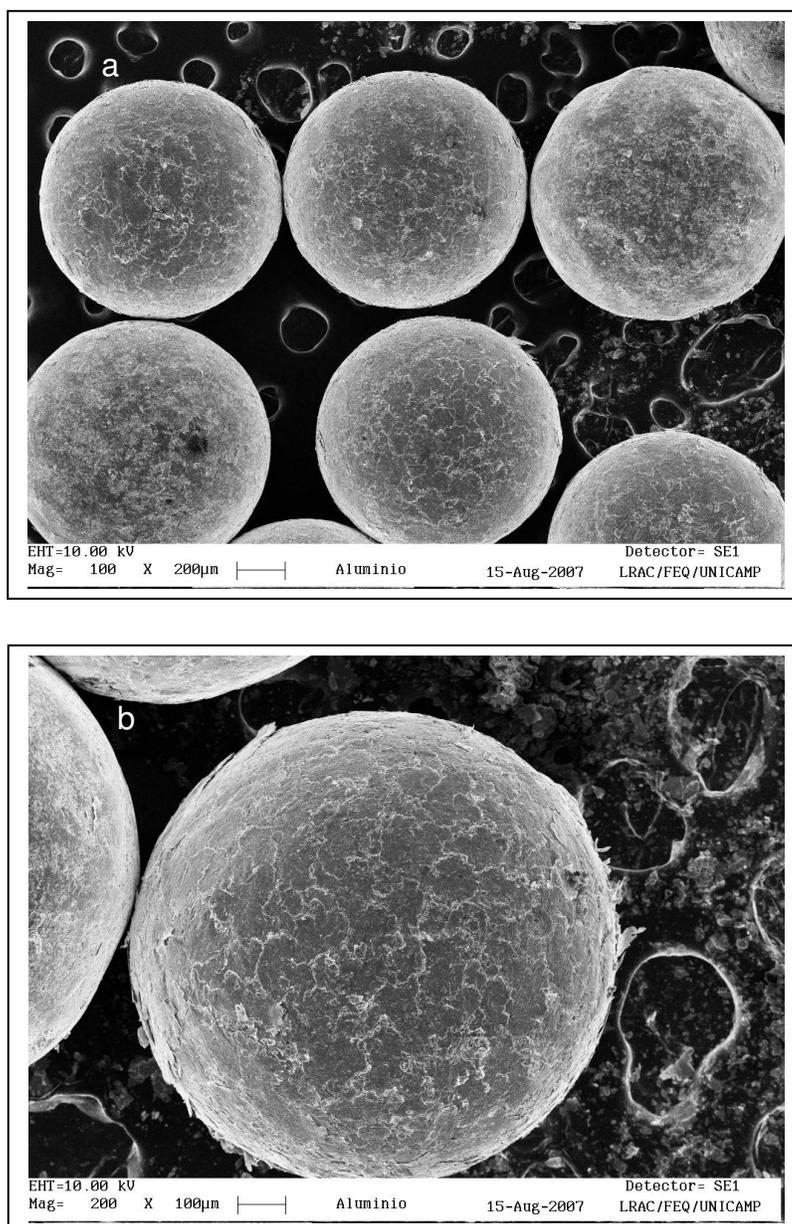


Figura 12: Morfologia da superfície das partículas de alumínio analisada por MEV em aumentos de: a) 100 vezes; b) 200 vezes.

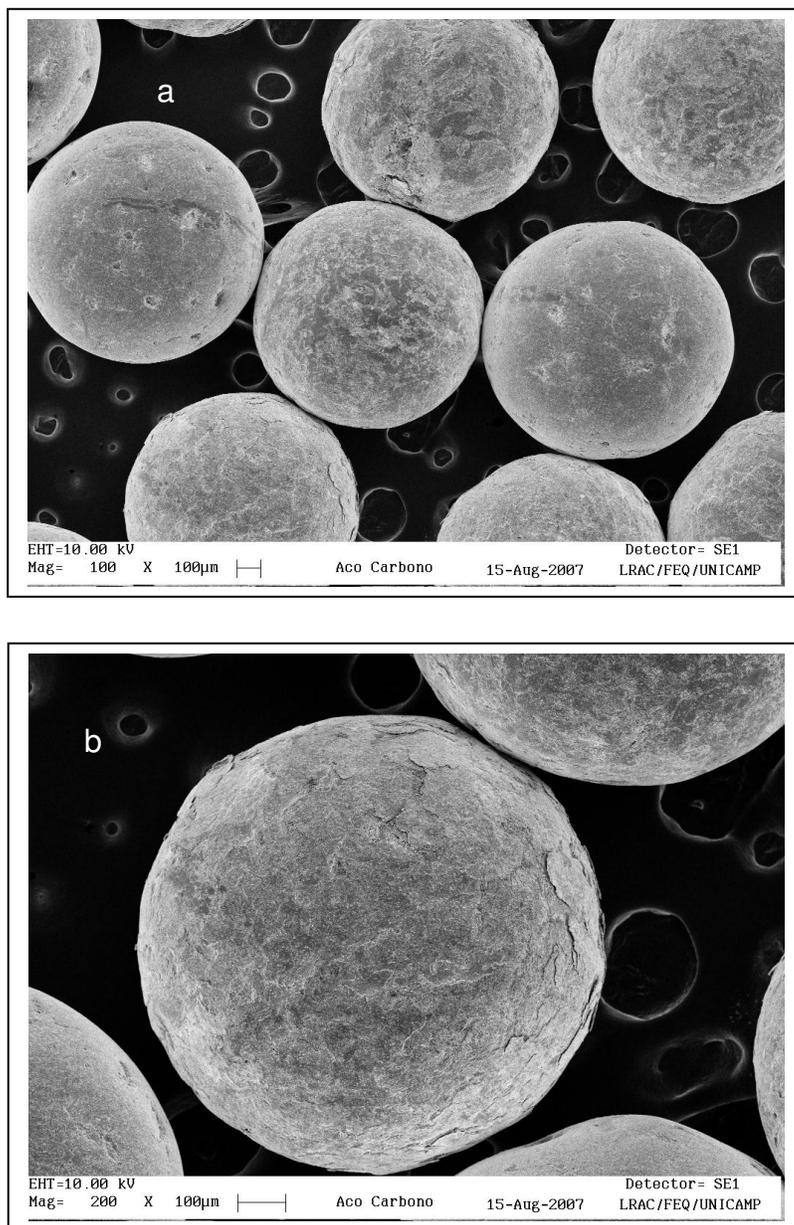


Figura 13: Morfologia da superfície das partículas de aço carbono analisada por MEV em aumentos de: a) 100 vezes; b) 200 vezes.

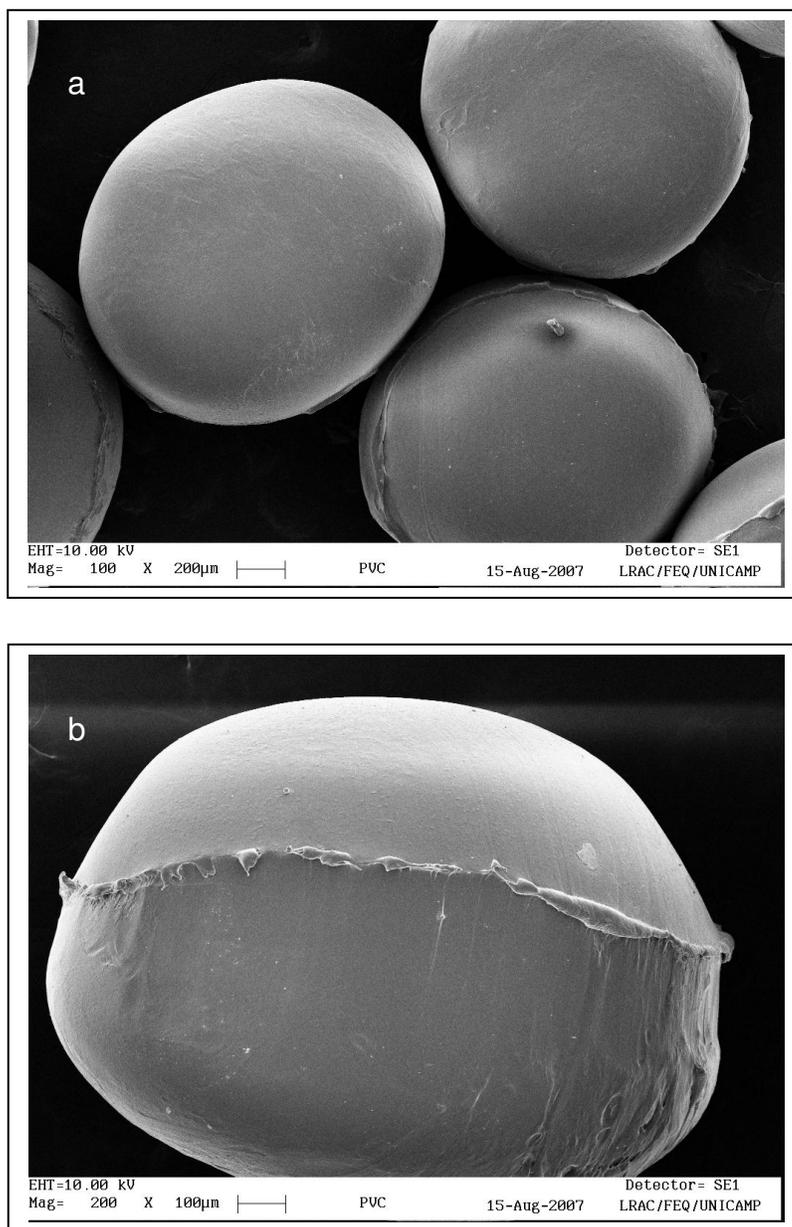


Figura 14: Morfologia da superfície das partículas de PVC analisada por MEV em aumentos de: a) 100 vezes; b) 200 vezes.

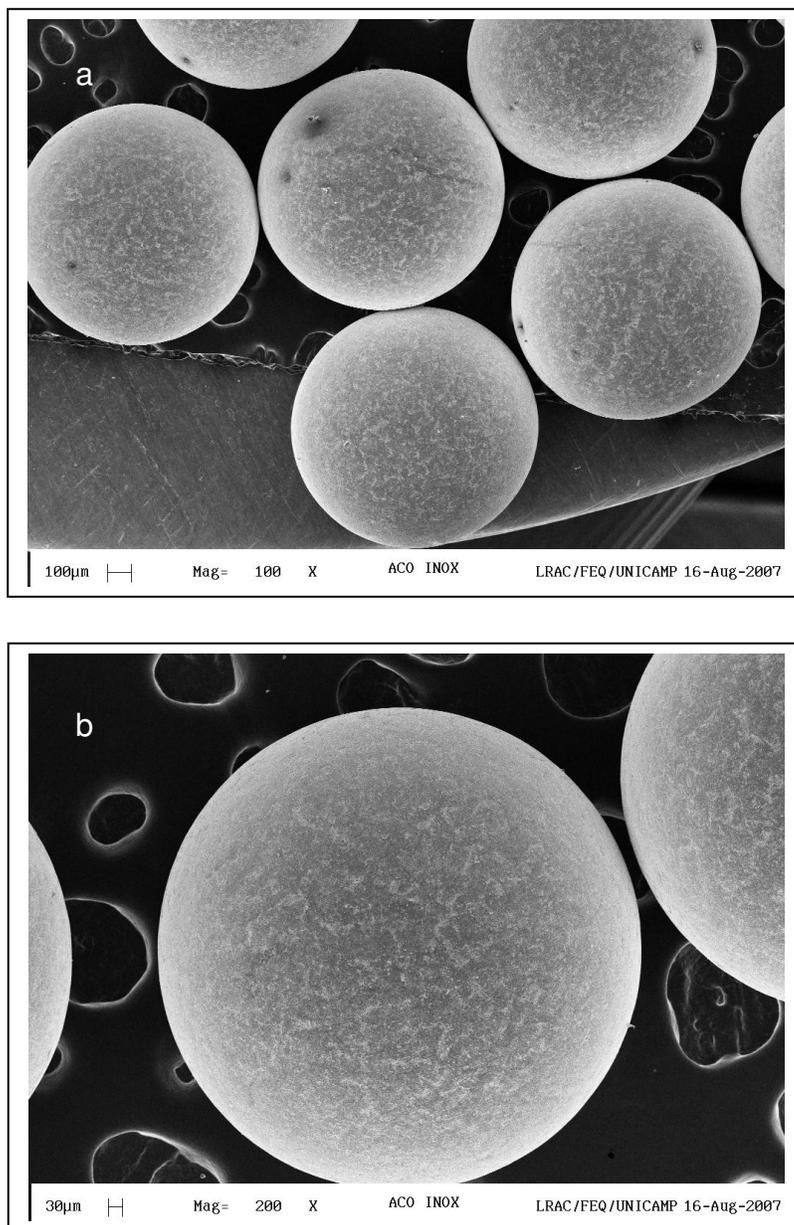


Figura 15: Morfologia da superfície das partículas de aço inoxidável analisada por MEV em aumentos de: a) 100 vezes; b) 200 vezes.

A análise por MEV das amostras de PVC (Figura 14) e aço inoxidável (Figura 15) mostra que as superfícies das micropartículas destes materiais são bastante lisas, e por esta razão houve dificuldade na detecção do tamanho e do volume de poros pela metodologia utilizada.

Se fossem utilizados somente os resultados da análise por MEV para avaliar a fixação de micro-organismos nas superfícies, já que é comum se supor que os micro-organismos não se fixam em superfícies lisas, ter-se-ia em ordem decrescente de rugosidade aparente o alumínio (Figura 12), o aço carbono (Figura 13), o aço inoxidável (Figura 15), o vidro (Figura 11) e por último o PVC (Figura 14).

Os resultados da Tabela 12 mostram que caso as partículas não fossem porosas, aquelas obtidas de PVC apresentariam a maior área superficial específica e conseqüentemente, maior volume, seguidas das partículas de vidro, alumínio e aço carbono. As partículas de aço inoxidável teriam a menor área e volume específicos.

A medida de ângulo de contato foi efetuada como parte da caracterização dos materiais, assim pode-se comparar a hidrofobicidade de cada amostra. Para a medida de ângulo de contato, foram utilizadas lâminas confeccionadas com os mesmos materiais das partículas esféricas, pois a medição nas partículas, devido a sua forma e tamanho, não foi possível. Por se tratar do mesmo material de construção inferiu-se que os resultados das lâminas seriam os mesmos que os das partículas. Os resultados das medidas dos ângulos de contatos estão demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados da medição dos ângulos de contato.

Material	Ângulo de contato (°)
Vidro	15
Alumínio	79
Aço Carbono	83
PVC	74
Aço Inoxidável	68

O aço carbono possui o maior ângulo de contato (83°) enquanto que o vidro possui o menor ângulo (15°). De acordo com outros estudos (Sinde e Carballo, 2000; Li e Logan, 2004), quanto maior o ângulo de contato, mais hidrofóbica é a superfície, favorecendo a adesão celular. Quanto menor o ângulo, maior é o espalhamento da gota sobre a superfície, e maior, portanto, é sua molhabilidade. Então, se a análise da superfície fosse efetuada somente com base neste parâmetro, o aço carbono seria o material mais susceptível à formação de biofilmes.

Como os ensaios de caracterização das partículas propiciaram diferentes conclusões quanto à susceptibilidade das superfícies à formação de biofilmes, e para facilitar a avaliação e comparação simultânea de todos os dados obtidos, foi estabelecida uma escala de cores, conforme listado na Tabela 17. Nesta escala encontram-se presentes as cores branco, cinza e preto, onde o branco indica valores baixos, o cinza valores intermediários, e o preto, valores altos para os resultados obtidos das características individuais determinadas em cada tipo de análise efetuada.

Diz-se que não há correlação entre os métodos quando ao se comparar seus resultados, há presença das cores branca e preta, que representariam os dois extremos na escala de cores. Isto indica divergências nos resultados obtidos pelas técnicas de caracterização utilizadas.

Teoricamente, as características que facilitariam a formação do biofilme são: pouco brilho (material fosco), superfície irregular, material hidrofóbico, alta área superficial (considerando ou não os poros), poros grandes e volumosos. Ou seja, predominância de tons escuros indicaria tendência de adesão celular e formação de biofilmes, enquanto maior frequência de tons claros apontaria menor tendência de adesão microbiana e formação de biofilmes.

Analisando conjuntamente estes resultados, embora sejam verificadas divergências nas características desejáveis do ponto de vista de formação de biofilmes, pode-se considerar o aço carbono e o alumínio como os mais susceptíveis à adesão microbiana, seguidos pelo vidro, enquanto que aço inoxidável e pelo PVC, seriam os menos propícios à adesão microbiana.

Tabela 17: Resultados da caracterização para comparação simultânea entre os materiais utilizados.

Material	Opacidade	Irregularidades superficiais (MEV)	Hidrofobicidade	Propriedades específicas		
				Área superficial considerando material poroso	Volume de poros	Diâmetro de poros
Vidro						
Aço carbono						
Aço inoxidável						
PVC						
Alumínio						

- Nível baixo da propriedade analisada
 Nível intermediário da propriedade analisada
 Nível alto da propriedade analisada

5.3. Análise da população microbiana do fluido de corte contaminado

Estes ensaios foram efetuados com o intuito de caracterizar a população microbiana no fluido de corte contaminado, e assim auxiliar a escolha dos microbicidas mais recomendáveis para os testes de erradicação. A Tabela 18 mostra a diversidade microbiana encontrada no fluido de corte testado.

Tabela 18: Quantificação da população microbiana encontrada no fluido de corte contaminado utilizado como inóculo nos testes de erradicação.

Tipo de Micro-organismo	População
Bactérias Heterotróficas totais (UFC/mL)	$9,7 \times 10^8$
Heterotróficas Esporuladas (UFC/mL)	$5,2 \times 10^4$
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	$6,0 \times 10^5$
Coliformes Totais (UFC/mL)	$3,2 \times 10^7$
<i>Aerobacter</i> sp (UFC/mL)	$< 10^2$
<i>Flavobacterium</i> (UFC/mL)	$< 10^2$
Bactérias Anaeróbias totais (cel/mL)	Presente a 10^6
Bactérias Sulfato Redutoras (cel/mL)	Presente a 10^5
Fungos Totais (UFC/mL)	$4,2 \times 10^3$
Leveduras (UFC/mL)	$5,0 \times 10^6$

Na indústria de usinagem de metais, tradicionalmente se verifica a presença de bactérias heterotróficas totais, leveduras e fungos filamentosos, tanto por análises indiretas (avaliação pH, desestabilização da emulsão) quanto diretas (por plaqueamento tradicional, por laminocultivos) (Passman, 1988; 1997). Os micro-organismos mais frequentemente encontrados no fluido de corte são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Desulfovibrio* sp., *Fusarium* sp. e *Candida* sp. (Passman, 1988). Embora a população microbiana do

fluido de corte utilizado não tenha sido identificada, pode-se inferir que o resultado do plaqueamento (Tabela 18), de certa forma, corrobora as afirmações de Passman (1998), pois na microbiota encontrada podem estar presentes, por exemplo, a *Pseudomonas aeruginosa* (entre a população de coliformes fecais), *Candida* sp. entre as leveduras, e o *Fusarium* sp. entre os fungos filamentosos. Destaca-se que tal estimativa de distribuição microbiana pode estar subestimando ou mesmo não contabilizando a presença alguns tipos celulares, já que se sabe que parte da população pode ser de difícil recuperação e propagação, como normalmente verificada para algumas bactérias anaeróbias.

A alta contaminação microbiana, encontrada neste fluido pode ser atribuída a diversos fatores, tais como a falta de Boas Práticas de Fabricação e de controle de processo (Passman, 1992 e 1997) da empresa de usinagem avaliada. Durante a coleta do fluido de corte verificou-se a falta de BPF em vários pontos do sistema fabril, como exemplo: a) contaminação da emulsão por óleo hidráulico oriundo de vazamentos; b) muita sujidades pelo chão que podem ser arrastadas pela água que escorre por entre as máquinas e canaletas; c) a qualidade baixa da água utilizada na diluição do óleo concentrado, pois por uma questão de economia, nem sempre a água é tratada e muitas vezes utiliza-se água de poços artesianos para este procedimento; d) presença de incrustações nas áreas de respingos.

Os resultados da quantificação microbiana mostraram grande diversidade na população presente no fluido, o que sugere a utilização de microbicida com amplo espectro de atuação contra os micro-organismos presentes.

5.4. Formação dos biofilmes na superfície de partículas de diferentes materiais

As características dos biofilmes formados em diferentes superfícies têm sido motivo de controvérsias. Assim, neste ensaio visou-se avaliar as possíveis diferenças da adesão microbiana às superfícies, verificando-se, a princípio, o tempo requerido para que a população atingisse a concentração mínima de $1,0 \times 10^6$ UFC/g, valor de referência para considerar o biofilme como maduro sob o aspecto prático (Marques e Manfio, 2004; Lucchesi, 2006), ou até a completa maturação do biofilme, estipulando-se

assim o tempo de incubação para a formação dos biofilmes em cada uma das superfícies.

Na indústria de usinagem de metais, tradicionalmente verifica-se a presença de altas concentrações de bactérias heterotróficas totais, leveduras e fungos filamentosos, por histórico do laboratório de microbiologia da Ipel Itibanyl Produtos Especiais Ltda. Nesta empresa verificou-se que 81% dos problemas de contaminação de emulsões da indústria de usinagem estão relacionados com as bactérias heterotróficas totais, por este motivo optou-se por efetuar os ensaios com estes micro-organismos, enquanto que fungos filamentosos são mais problemáticos na área onde ocorrem respingos.

Para a formação dos biofilmes na superfície das partículas, a partir do óleo de corte naturalmente contaminado, foi utilizada a metodologia descrita no item 4.2.4 e os resultados obtidos estão indicados na Figura 16, que mostra a curva de crescimento dos biofilmes nas cinco superfícies testadas. As análises foram efetuadas somente em meio de cultura TSA, pois este possibilita o crescimento da população microbiana mais frequentemente encontrada em fluido de corte, constituída pelas bactérias heterotróficas totais.

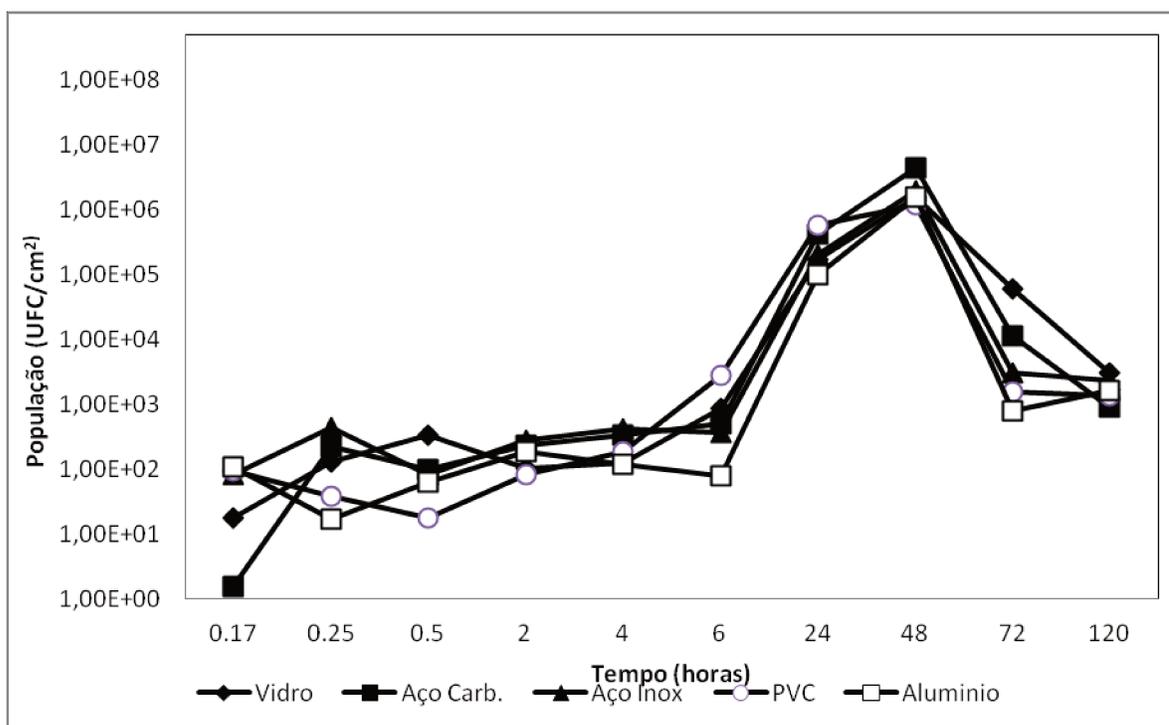


Figura 16: Curva de crescimento dos biofilmes nas cinco superfícies testadas.

Os resultados estão em concordância com as observações do *Center for Biofilm Engineering* dos EUA (2011) e mostram que independentemente da superfície testada, a população microbiana apresentou comportamento semelhante. Não se pode afirmar que uma superfície é mais suscetível à fixação de micro-organismos que outra, principalmente por micro-organismos oriundos de biofilmes maduros, ou seja, de biofilmes já instalados e adaptados às condições ambientais.

Boari *et al.* (2009), entretanto, verificaram diferença na adesão em aço inoxidável, entre células de *Staphylococcus aureus* e de *Aeromonas hydrophila*, tanto em monocultura como quando se misturam as culturas das duas cepas.

Segundo Vamanu *et al.* (2010), fatores físicos e químicos influenciam a adesão das células e a proliferação do biofilme. Como neste estudo estes fatores foram mantidos constantes, não se pode observar a diferença na formação dos biofilmes nas diferentes superfícies. Takahashi *et al.* (2010) afirmam que a hidrofobicidade do PVC é um dos fatores para adesão e formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em monocultura.

Todas as superfícies que apresentaram população celular de, no mínimo, $1,0 \times 10^6$ UFC/g foram consideradas como biofilmes maduros para uso nos ensaios de susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Paralelamente, ensaios com *Pseudomonas aeruginosa* foram efetuados para se comparar os resultados dos biofilmes formados a partir de monocultura com os obtidos com os micro-organismos do fluido de corte naturalmente contaminado. Os resultados dos biofilmes formados nas superfícies das partículas estão demonstrados na Figura 17 e os resultados da população microbiana no líquido estão demonstrados na Tabela 19.

Observa-se crescimento da população até 1,5 horas de incubação e subsequente queda no número de indivíduos até 4 horas de incubação. Pode-se inferir que este comportamento seja típico da curva de crescimento de biofilmes, onde a fase de adaptação, além de mais longa, apresenta esta queda no número de indivíduos ao final de algumas horas, quando comparada à curva de crescimento dos micro-organismos livres (planctônicos), visto que ocorre em todos os materiais.

Uma das hipóteses prováveis desta queda na população do biofilme pode ser atribuída à diferença de comportamento fenotípico entre células planctônicas e células sésseis, onde a transição entre a fase da adaptação e a fase logarítmica se dá pela diminuição da população do biofilme, já que a população microbiana na suspensão não apresentou o mesmo comportamento, ao contrário, teve um aumento de cerca de 100 vezes durante as 24 primeiras horas de ensaio (Tabela 19).

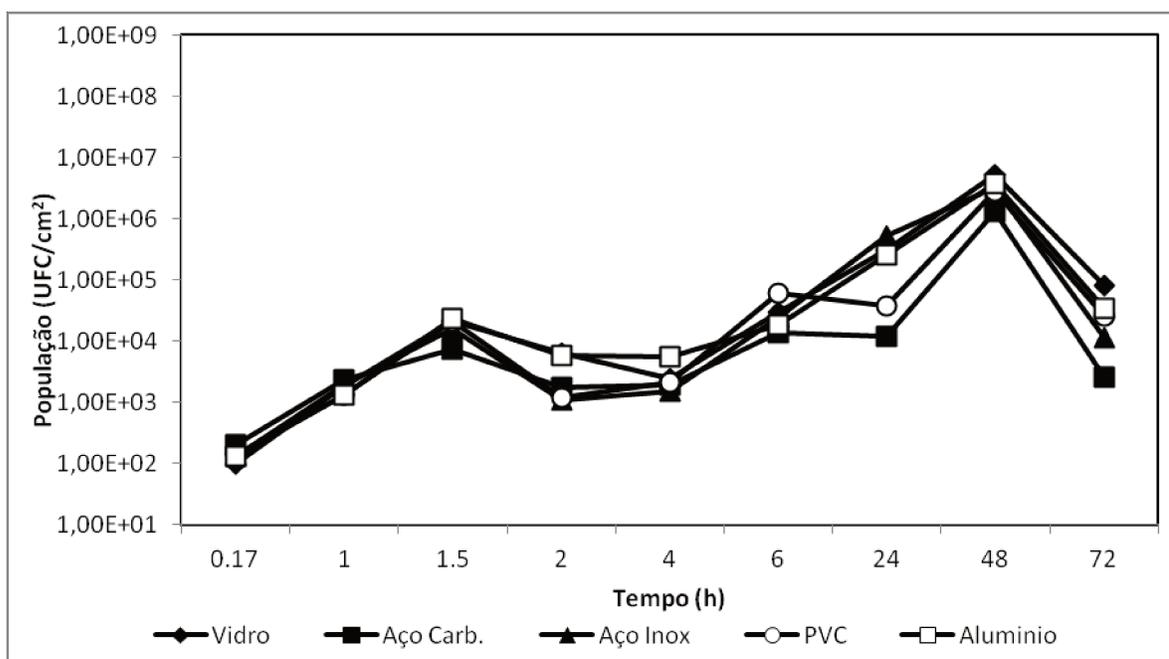


Figura 17: Curva de crescimento do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície das partículas dos cinco materiais.

Outra hipótese para explicar este fenômeno é através do conceito de “*Quorum Sensing*” (QS) como um fator controlador do crescimento e proliferação dos micro-organismos nas fases de crescimento do biofilme. Nesta hipótese, a quantidade de auto-indutor produzido pelas células aumenta quando a população microbiana se encontra no meio da fase logarítmica ou no início da fase estacionária de crescimento, assim, o QS é ativado quando a concentração de auto-indutor atinge um nível suficiente para disparar o processo de alteração da expressão gênica, inibindo ou ativando determinados genes (Hardman *et al.* 1998), incluindo o que regula a proliferação

celular.

Tabela 19: Quantificação da população de *Pseudomonas aeruginosa* em suspensão em meio de cultivo (TSA).

Tempo de amostragem (horas)	População de <i>P.aeruginosa</i> na suspensão (UFC/mL)
0	$2,3 \times 10^6$
0,5	$3,9 \times 10^6$
1,0	$6,0 \times 10^6$
1,5	$7,8 \times 10^6$
4,0	$5,5 \times 10^6$
6,0	$8,6 \times 10^7$
24	$1,4 \times 10^8$
48	$5,5 \times 10^8$
72	$6,9 \times 10^8$

Para estudar mais detalhadamente a causa da diminuição da população após as 48 horas de incubação, efetuou-se o teste de formação de biofilme a partir do óleo de corte contaminado na superfície das partículas dos cinco materiais utilizados com acréscimo de 1% de meio de cultura fresco em cada tubo após 48 horas de incubação para prover outros nutrientes requeridos pelas células, supondo-se que pudesse estar ocorrendo a falta de algum nutriente essencial, como um fator limitante.

Conforme mostra a Figura 18, com a adição do meio de cultura fresco houve crescimento contínuo do biofilme no período entre 48 e 72 horas. Mesmo com o desprendimento celular, típico da formação do biofilme, a população microbiana aumentou, tanto no biofilme quanto na emulsão, com o passar do tempo. Este resultado permite concluir que a morte da população nos ensaios anteriores se deu pela falta de

nutrientes nos tubos contendo as partículas.

Estes resultados mostram que em um processo industrial onde cada batelada de produto produzido nutre o biofilme continuamente, a população microbiana aderida à superfície dos tanques, reatores e tubulações, dentre outros equipamentos, tende a aumentar muito com o passar do tempo, piorando consideravelmente o problema de contaminação industrial. Além de a contaminação se alastrar por todo processo, devido ao desprendimento natural das células, o biofilme fixo a esta superfície aumenta sua espessura, chegando muitas vezes a ser visível a olho nu.

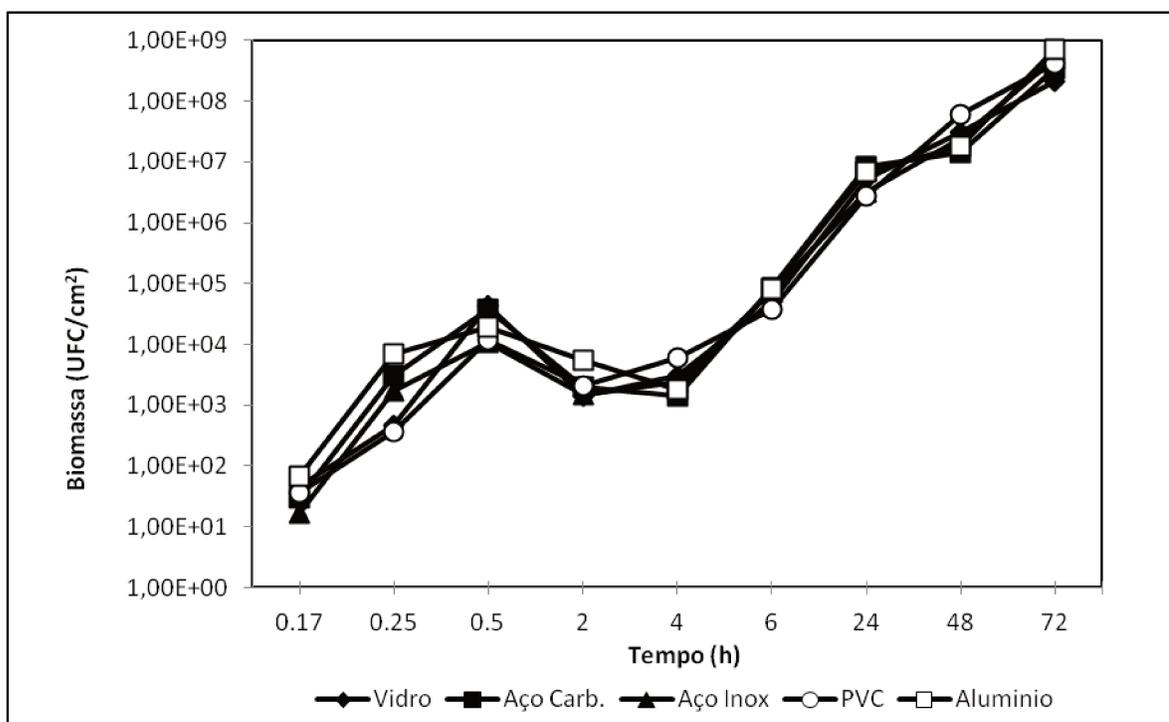


Figura 18: Curva de crescimento dos biofilmes resultantes do óleo de corte contaminado com acréscimo de meio de cultura fresco após 48 horas de incubação.

Destaca-se que os micro-organismos do fluido de corte naturalmente contaminado não foram isolados para serem utilizados individualmente ou na forma de mistura como inóculo, pois Lucchesi (2006) mostra em seus resultados que micro-organismos isolados da emulsão naturalmente contaminada que são posteriormente

misturados para formar um inóculo misto não apresentam a mesma capacidade de formação de biofilmes na superfície de partículas de vidro que a cultura nativa. Provavelmente ocorre perda de capacidade de fixação quando as células são retiradas de seu habitat, ou o favorecimento da recuperação de micro-organismos não aderentes.

5.5. Estudo da adesão microbiana nas diferentes superfícies por microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura mostrou algumas diferenças na EPS dos biofilmes formados nas cinco superfícies testadas. Foram analisadas as partículas de alumínio, aço carbono, aço inoxidável, PVC e vidro em cinco tempos de incubação diferentes, sendo 10 minutos, 1 hora, 6 horas, 24 horas e 48 horas, e com aumentos fixados em menor aumento (85 vezes), 2000 vezes e 10000 vezes.

Os resultados dos cinco tipos de partículas no tempo de incubação de 10 minutos mostraram a fixação de poucas células microbianas, em forma de cocos. A quantificação das bactérias heterotróficas totais, no mesmo período de incubação, mostra que o número de células viáveis variou entre $2,5 \times 10^2$ UFC/cm² no aço carbono a $3,7 \times 10^3$ UFC/cm² na superfície de alumínio; estes resultados comprovam a pouca quantidade de células visualizadas por MEV no tempo de 10 minutos.

A análise das partículas de alumínio no tempo de incubação de 1 hora mostrou que as células ficam inclusas na matriz (Figura 19 C2), também foi possível perceber os apêndices de interações entre células e EPS (Figura 19 C2). Na observação das partículas com período de incubação de 6 horas, foi possível verificar a fixação de células em forma de bastonetes. O número de células do biofilme aumentou com o tempo de incubação (Figura 19 de C1 a C4).

Em todos os tempos de incubação verificou-se que a morfologia da EPS dos biofilmes formados na superfície do alumínio assemelha-se a uma rede (Figura 19 de C1 a C5).

As análises de MEV das partículas de aço carbono mostraram que a EPS nestas partículas parece ser mais densa e as células permanecem inclusas nesta matriz (Figura 20 de C1 a C5). Com o aumento do tempo de incubação, o número de células na superfície também aumenta, confirmando os resultados obtidos na quantificação da

população dos biofilmes formados (Figura 16).

Com relação às partículas de aço inoxidável, embora os resultados da quantificação também mostrem aumento na população microbiana (Figura 16), pela análise por MEV, o número de células diminuiu (Figura 21 de C1 a C5). Este fato pode ser atribuído ao tratamento drástico de preparação das amostras para a MEV, o que indica que os biofilmes formados tanto na superfície do aço inoxidável quanto do vidro (Figura 23 de C1 a C5) parecem ter fixação mais fraca nestes materiais.

A Figura 22 (B1 e B2) mostra que a superfície do PVC é rugosa e que as células microbianas ficam imersas na EPS (Figura 22 C1 a C5), como no aço carbono. A rugosidade verificada na superfície do PVC pode ser resultante da extração do plastificante durante a fixação dos biofilmes, já que a análise por MEV das partículas de PVC sem tratamento não apresentaram a mesma irregularidade.

A partir do tempo de incubação de 6 horas a superfície do PVC apresentou mudança significativa, passando a ter rachaduras e sulcos (visíveis na Figura 22 A5 e B5), deixando parcialmente visível a estrutura interna da partícula. Nestas regiões não foi possível visualizar células microbianas, que se proliferam preferencialmente na parte externa das rachaduras ou sulcos (Figura 22 B3 a B5).

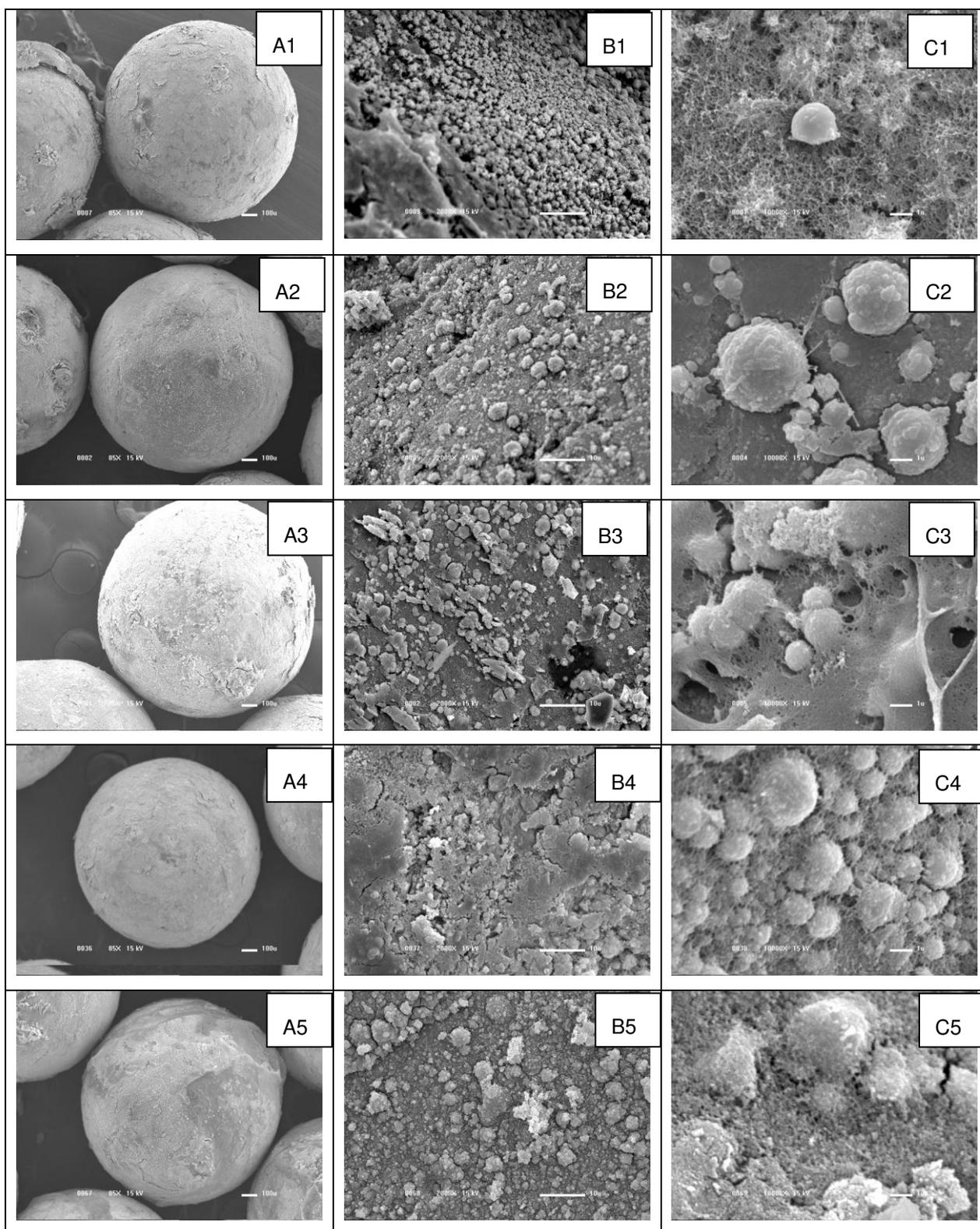


Figura 19: Análise por MEV de biofilmes em partículas de alumínio, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3) 6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h.

A MEV nas partículas de vidro não resultou em imagens adequadas, devido, principalmente, ao fato de o vidro não ser um bom material condutor, o que dificultou o acerto do foco na superfície. Além disso, não foi possível verificar o aumento no número de células com o aumento do tempo de incubação, embora a quantificação da microbiota do biofilme mostre o contrário (Figura 16). Este fato corrobora a hipótese de que no vidro a remoção do biofilme é facilitada, apesar de ser susceptível à fixação celular. Neste material, percebe-se que as poucas células que não se soltaram diante do tratamento das partículas para a análise por MEV estão fixas principalmente ao redor de poros (Figura 23 de C2 a C5).

Foi efetuada uma tentativa de verificar a formação dos biofilmes obtidos nas superfícies das partículas dos cinco materiais testados por Microscopia de Força Atômica, no Instituto de Física GLEB WATAGHIN da Unicamp, porém não foi possível a observação, pois a sonda do equipamento em questão tendia a aderir ao biofilme da superfície das partículas, não se movimentando adequadamente. Como outros estudos mostram que este procedimento é viável para a observação de biofilmes de, por exemplo, *Xylella fastidiosa* (Lorite, 2011), supõe-se que o fracasso da observação, neste caso, possa ser atribuído à EPS produzida pelos micro-organismos nativos oriundos do fluido de corte contaminado.

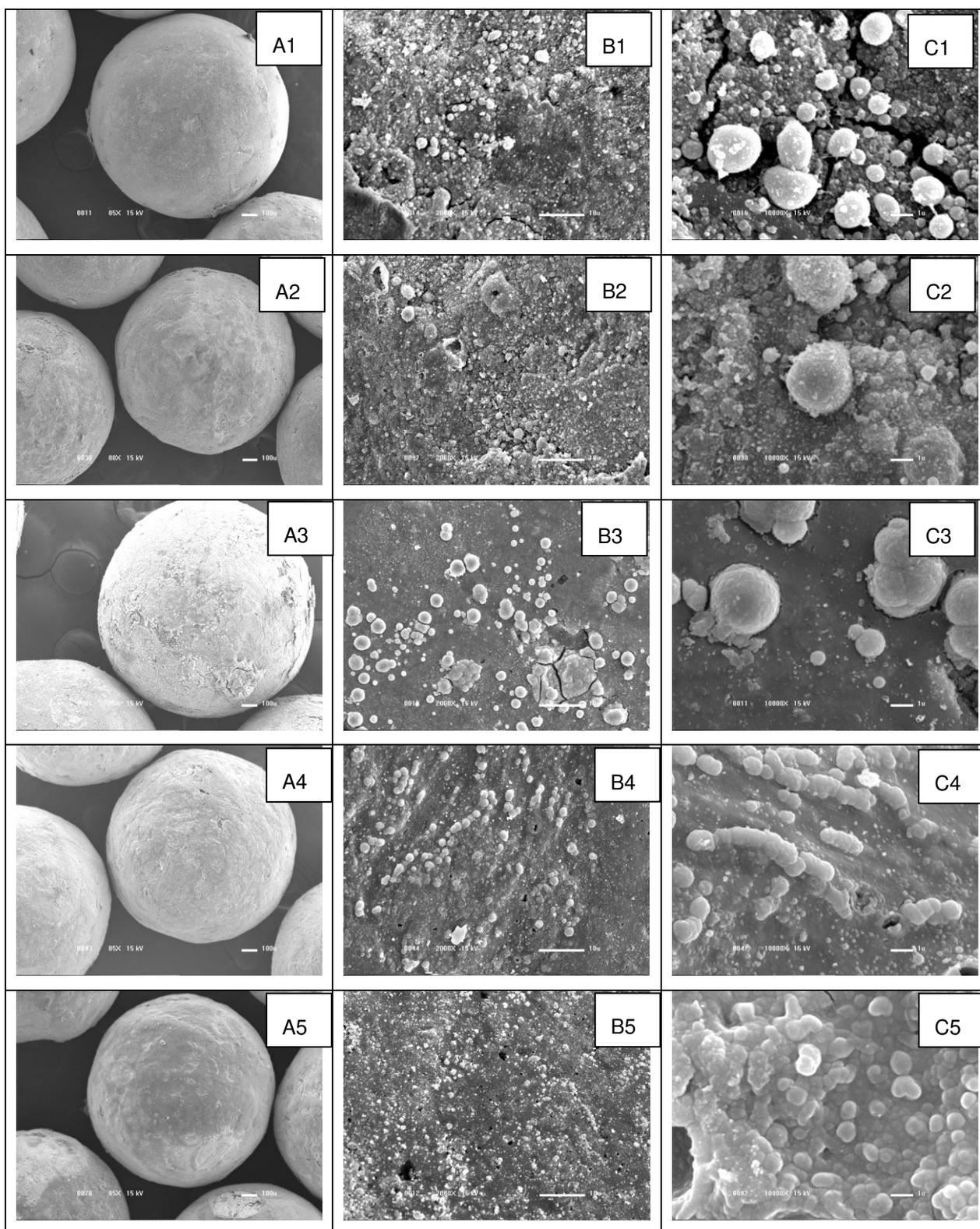


Figura 20: Análise por MEV de biofilmes em partículas de aço carbono, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3) 6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h.

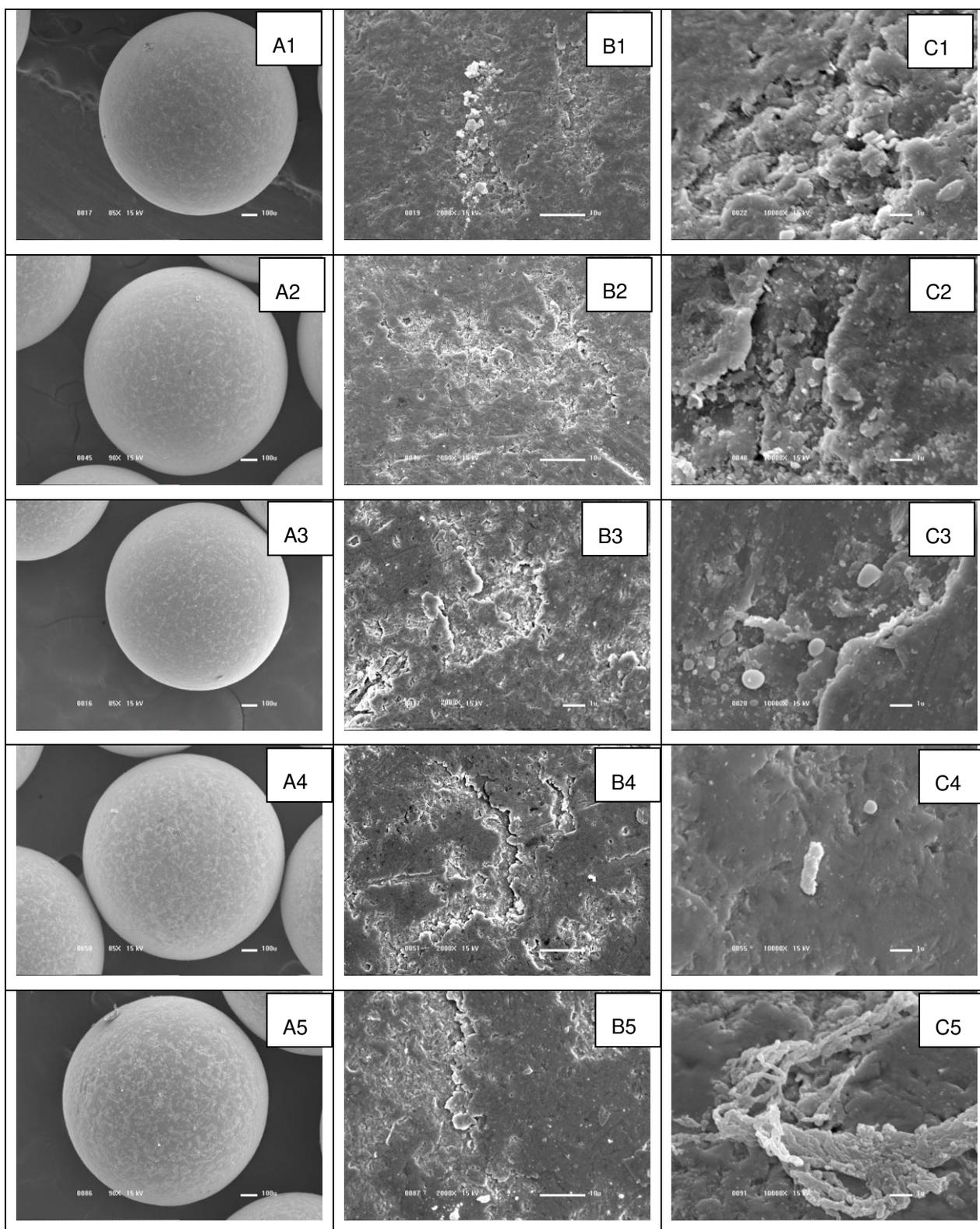


Figura 21: Análise por MEV de biofilmes em partículas de aço inoxidável, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3) 6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h.

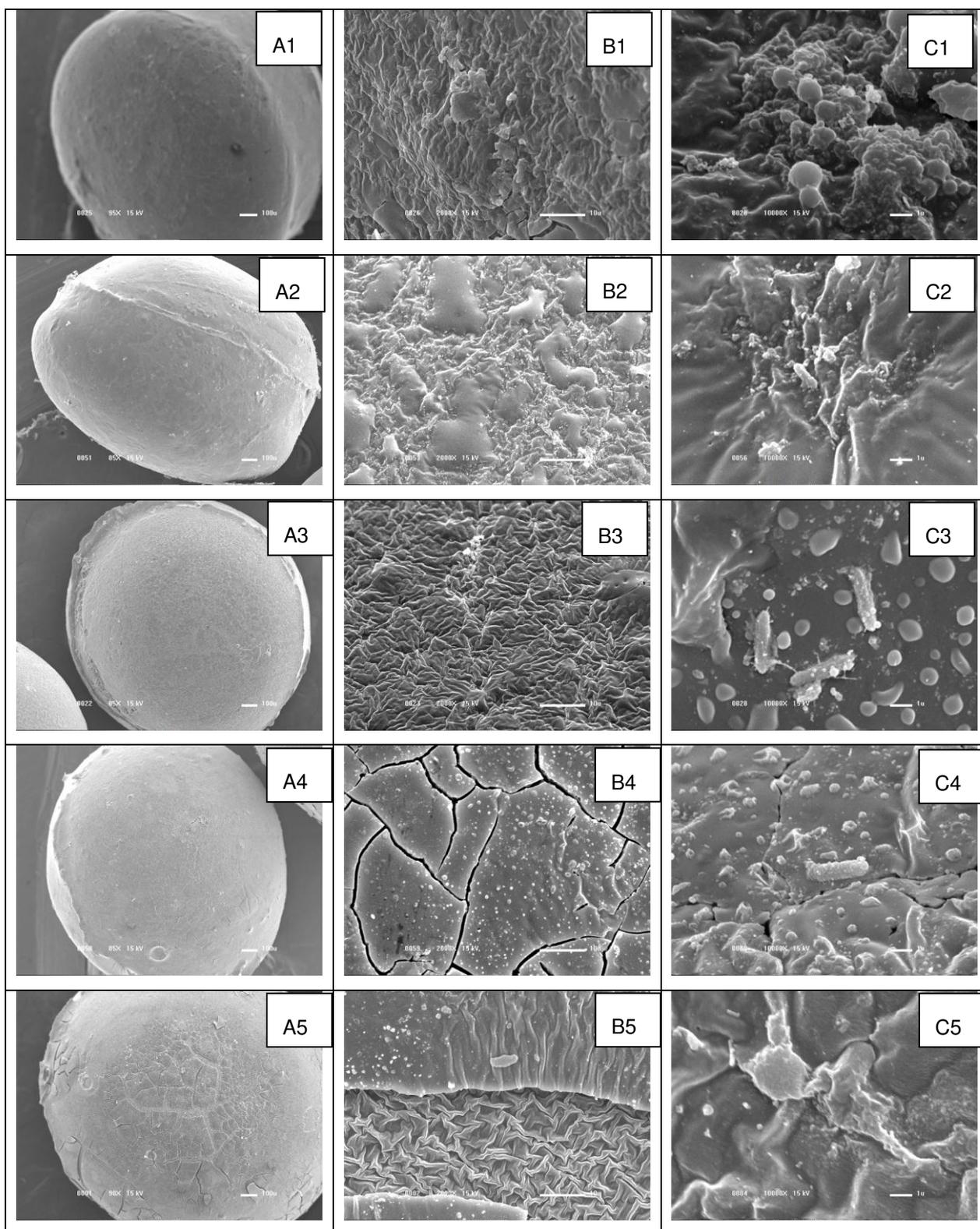


Figura 22: Análise por MEV de biofilmes em partículas de PVC, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3) 6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h.

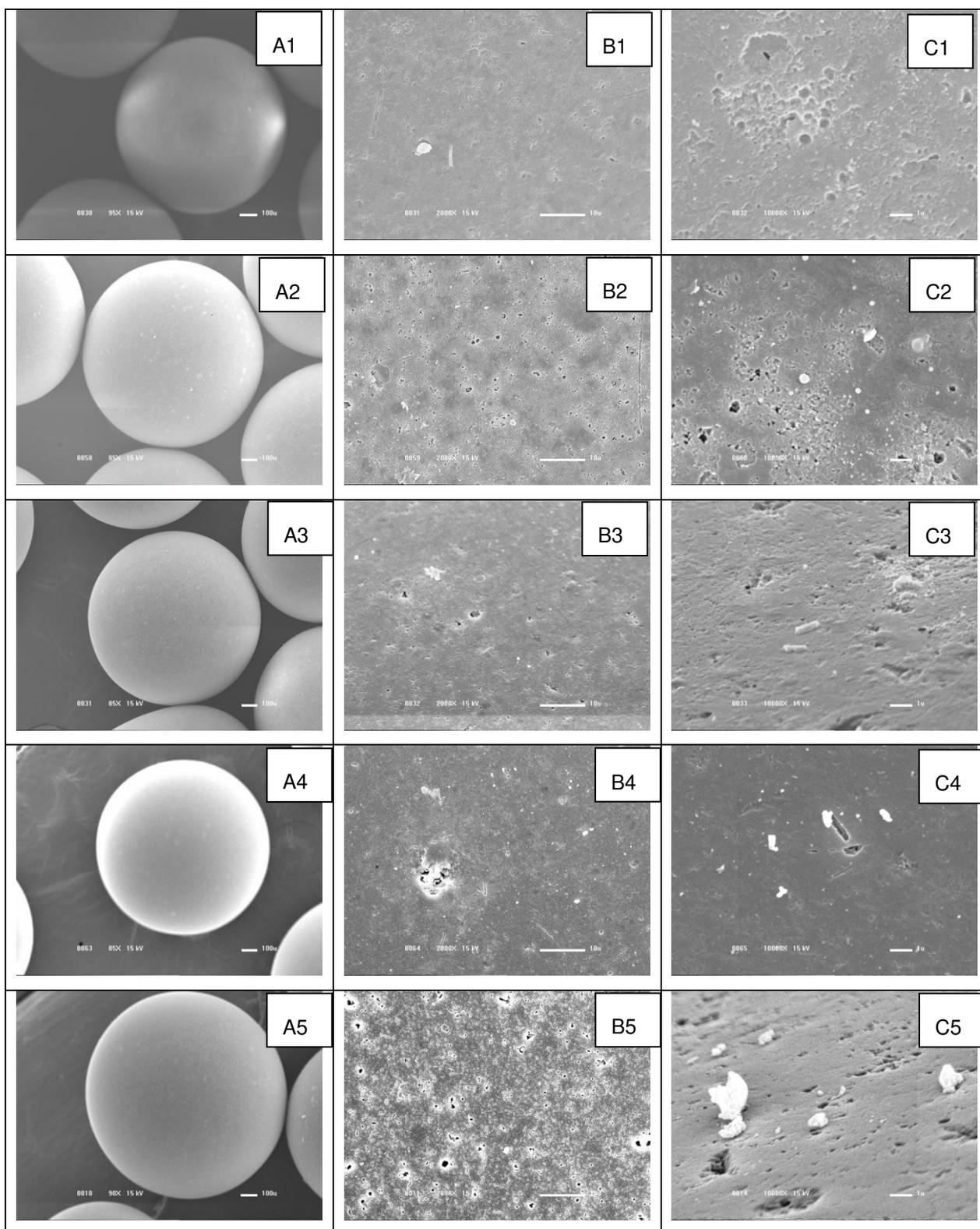


Figura 23: Análise por MEV de biofilmes em partículas de vidro, com aumentos progressivos em cada linha, da esquerda para a direita de: A) 85; B) 2000; e C) 10000 vezes. Amostras incubadas por: 1) 10 min; 2) 1 h; 3) 6 h; 4) 24 h e; 5) 48 h.

5.6. Estudo da população microbiana dos biofilmes por DGGE - eletroforese em gel de gradiente desnaturante

Os ensaios foram efetuados conforme descrito no item 4.2.4. Esta análise teve por objetivo principal verificar a diferença entre a população microbiana aderida no início e no final do ensaio.

A análise das comunidades microbianas de maneira independente de cultivo mostrou perfis de bandas complexos (Figura 24). A simples observação dos perfis de banda de cada uma das amostras mostrou a existência de algumas alterações nos diferentes tratamentos. Entretanto, foi observado que este padrão de bandas foi formado de forma independente do material das partículas. O tempo de incubação foi o fator de maior impacto sobre a diversidade microbiana analisada, visto que foi observada uma diferença grande de perfil eletroforético entre os tempos amostrados (10 minutos, 1, 6, 24 e 48 horas de cultivo).

Os perfis de banda da DGGE revelaram diferenças pontuais nos distintos tempos de incubação. Em alguns destes tempos, não foi possível obter perfis em tempos específicos, provavelmente devido às limitações da técnica aplicada. As diferenças foram observadas mais facilmente nas análises de componentes principais.

Pela Análise de Componentes Principais (PCA), foi observado um agrupamento associado ao tempo de incubação, visto que tempos menores (10 minutos e 1 hora) ficaram distantes dos tempos maiores (24 e 48 horas) no gráfico de PCA (Figura 25). Isto confirma que o tempo foi o maior responsável pela constituição do biofilme sobre as pérolas. Vale a pena observar a ocorrência de uma banda com destaque nas amostras de 48 horas, sendo esta não suficiente para causar a separação neste gráfico, mas com possível função específica neste tratamento. Na análise da PCA, as separações observadas no Gráfico indicam a ocorrência de grupos bacterianos distintos entre os diferentes períodos de incubação, sendo tal observação válida para os períodos iniciais de análise. Com o aumento do tempo de incubação ocorre uma maior aproximação dos perfis obtidos para as diferentes amostras, sendo que no período de 48 horas, as amostras se agrupam, demonstrando esta similaridade.

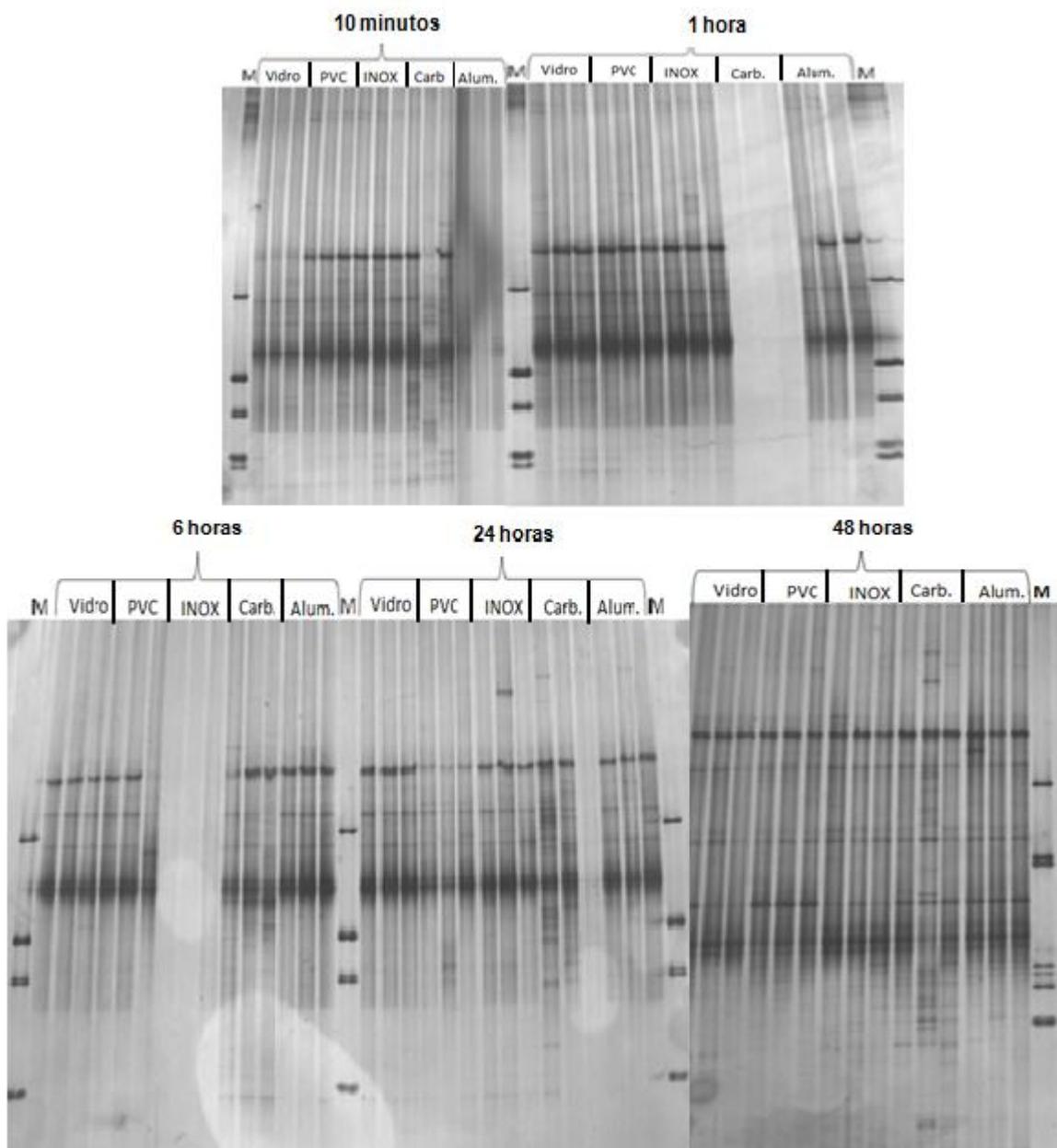


Figura 24: Perfis de DGGE para a comunidade bacteriana dos biofilmes formados nas partículas de diferentes materiais (vidro, PVC, aço inoxidável, aço carbono e alumínio), nos tempos de incubação de 10 minutos, 1 h, 6h, 24 h e 48 h.

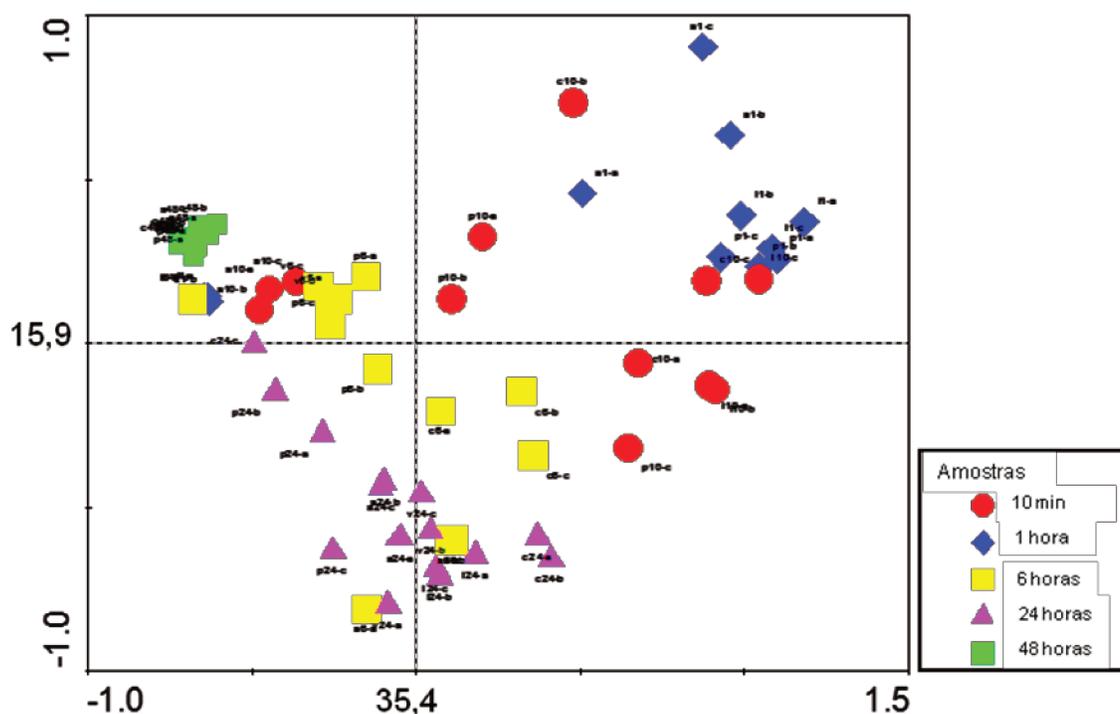


Figura 25: Análise de Componentes Principais (PCA) entre o perfil de bandas de DGGE de Bactérias e os fatores ambientais (material das partículas e tempo de cultivo). Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância correlacionada entre os tratamentos no respectivo eixo.

A técnica adotada não permitiu realizar a identificação dos micro-organismos presentes nos biofilmes, pois houve a necessidade de efetuar a coloração dos géis com prata impossibilitando que fossem utilizados para a replicação do DNA utilizado na identificação. O direcionamento do presente projeto foi para o estudo de comunidades mistas, encontradas em sistemas industriais reais e complexas. A abordagem molecular desejável poderia envolver algumas repetições das bandas principais da DGGE, com pequenas variantes nas condições de eletroforese, e assim, separar as bandas de DNA para posterior identificação. Desta forma, seria possível montar uma biblioteca de clones para cada tipo de suporte, para tempos distintos. Entretanto, para a montagem de uma biblioteca de clones deste fluido de corte seria necessário efetuar em torno de 1000 identificações, devido ao número de bandas presentes nos géis, o que não foi

possível realizar no presente estudo.

5.7. Determinação da concentração mínima de biocida para a erradicação dos biofilmes formados nos diferentes materiais

Os biofilmes foram produzidos de acordo com o item 4.2.4. Neste experimento foram testados vários tempos de geração de biofilmes, sendo utilizados três tubos por amostragem. Os biofilmes gerados foram utilizados nos testes com diferentes concentrações de biocida, em triplicata para cada condição de teste.

As concentrações indicadas pelo fabricante dos microbicidas para preservar a emulsão óleo/água, usualmente denominadas “concentração de uso” foram utilizadas como concentrações de partida para os testes com os antimicrobianos. Nas “concentrações de uso” o biocida tem o papel de manter uma população microbiana controlada na emulsão, de forma a não causar alterações significativas nas características do fluido.

Embora as concentrações de controle sejam importantes para a rotina industrial, em algumas situações é necessário erradicar o biofilme. Esta situação ocorre quando a contaminação é muito intensa e fora de controle, nas paradas para a higienização da planta, e também quando ocorrem as trocas de fluido.

Nos testes de susceptibilidade a agentes antimicrobianos foram testadas, além de na concentração de uso, em concentrações de 10 vezes, 50 vezes e 100 vezes a concentração de uso. Apesar destas concentrações elevadas, em alguns casos, as dosagens não foram suficientes para matar os micro-organismos em biofilmes. Nestes casos, também foram utilizadas outras concentrações, dependendo do biocida utilizado, como as apresentadas na Tabela 20.

Neste estudo, foi considerado que a concentração eficaz para a erradicação do biofilme é aquela capaz de reduzir a população microbiana inicial a menos de 10 UFC/g de suporte (partículas). Os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 26 a 30. Na Tabela 20 estão indicados os valores de concentração de cada biocida recomendados pelo fabricante e os valores efetivamente determinados como requeridos para a

erradicação dos biofilmes formados na superfície dos cinco materiais testados utilizados.

Destaca-se que os biocidas selecionados para este estudo, com exceção do BP-509, possuem em sua formulação os ativos antimicrobianos mais utilizados nas empresas de usinagem de metal. O BP-509 foi escolhido para verificar se devido ao seu mecanismo de ação (“slow kill”) poderia ser empregado como preservante na estratégia de manutenção.

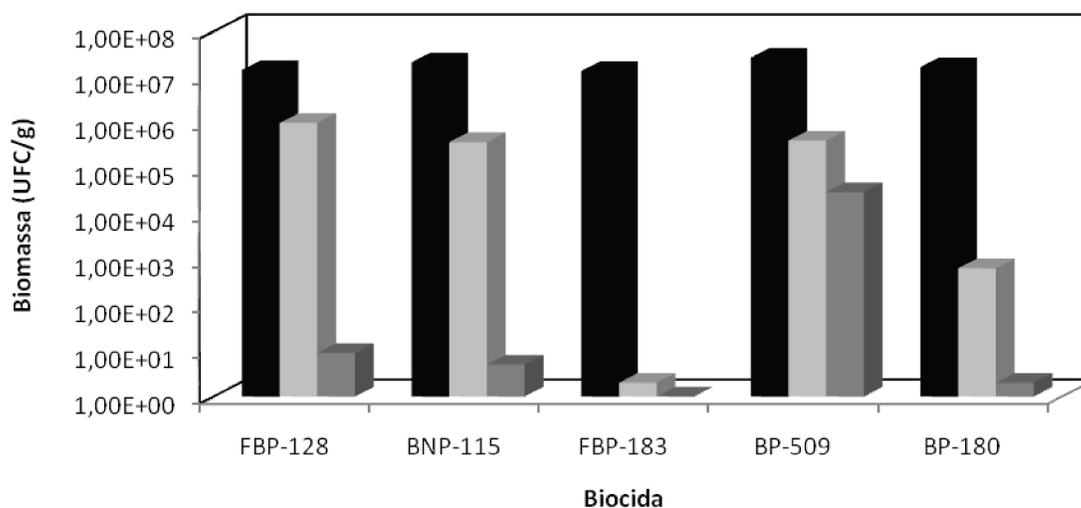


Figura 26: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície de partículas de vidro (média de três ensaios independentes). ■ Concentração de uso; ■ 50 vezes a concentração de uso e ■ 100 vezes a concentração de uso.

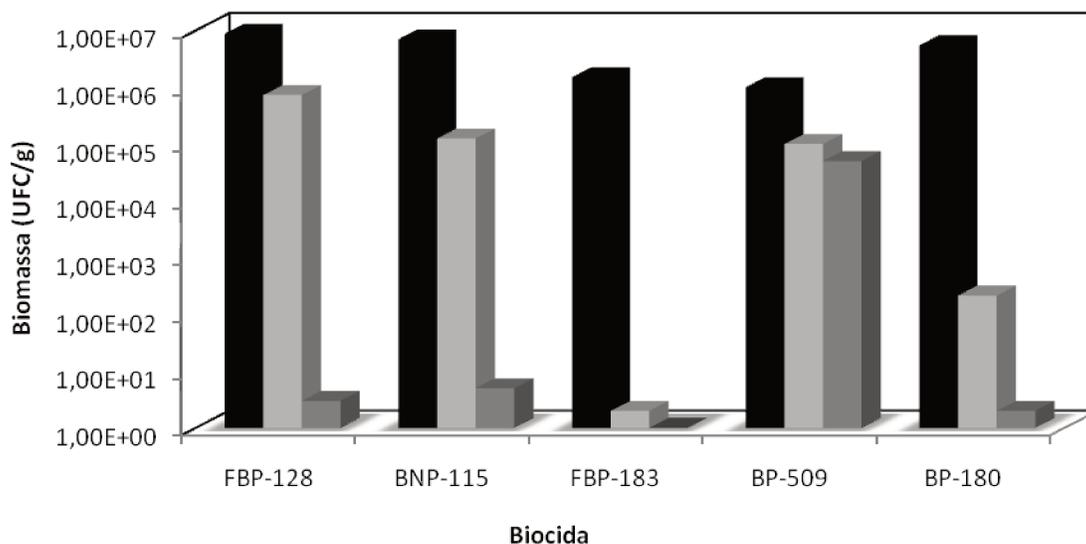


Figura 27: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície de partículas de aço carbono (média de três ensaios independentes). ■ Concentração de uso; □ 50 vezes a concentração de uso e ▒ 100 vezes a concentração de uso.

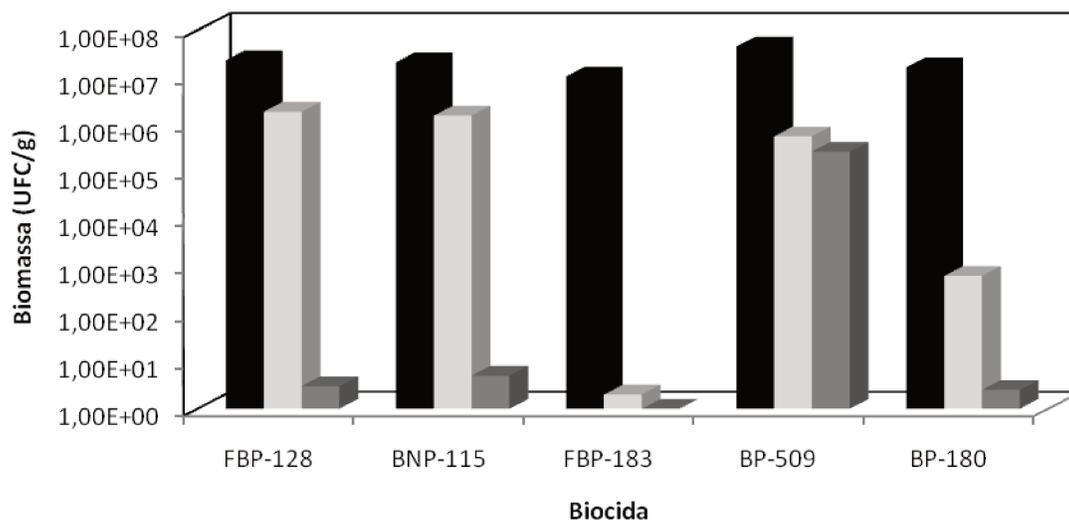


Figura 28: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície de partículas de aço inoxidável (média de três ensaios independentes). ■ Concentração de uso; □ 50 vezes a concentração de uso e ▒ 100 vezes a concentração de uso.

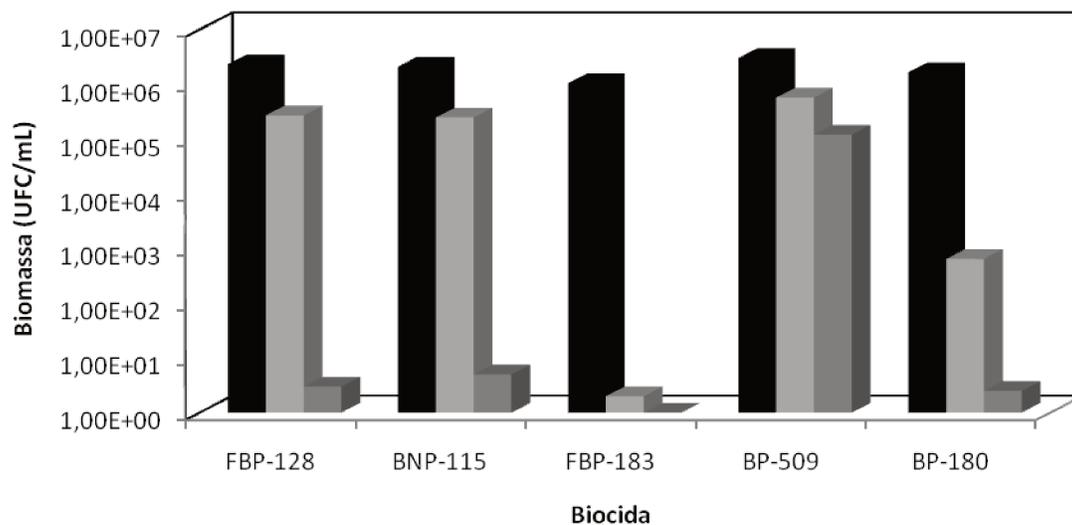


Figura 29: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície de partículas de PVC (média de três ensaios independentes). ■ Concentração de uso; □ 50 vezes a concentração de uso e □ 100 vezes a concentração de uso.

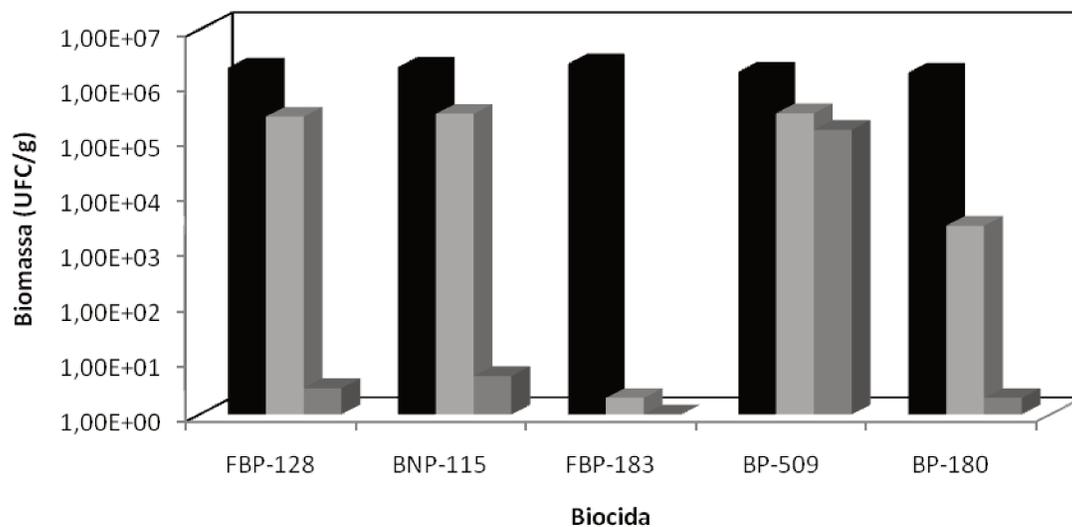


Figura 30: Susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície de partículas de alumínio (média de três ensaios independentes). ■ Concentração de uso; □ 50 vezes a concentração de uso e □ 100 vezes a concentração de uso.

Tabela 20: Concentrações Mínimas de Erradicação dos Biofilmes (CMEB) determinadas para os diferentes biocidas testados.

Concentração utilizada	Biocidas				
Biocidas	FBP-128	BNP-115	FBP-183	BP-509	BP-180
Concentração Tradicional de uso (%)	0,10	0,12	0,10	0,15	0,10
CMEB (%)					
- Vidro	12	15	5	20	9
- Aço carbono	12	15	5	20	9
- Aço inoxidável	12	15	5	20	9
- Alumínio	12	15	5	20	9
- PVC	12	15	5	20	9
Aumento requerido em relação à concentração tradicional de uso	120x	125x	50x	133x	90x

Nas cinco superfícies testadas o biocida menos eficaz foi o BP-509, pois a concentração máxima testada (100 vezes a concentração indicada pelo fabricante) não foi suficiente para erradicar o biofilme formado na superfície dos cinco materiais testados. Este desempenho já era esperado, uma vez que os agentes ativos que compõem o BP-509 (solução de isotiazolinonas e bronopol) possuem ação mais lenta que os demais produtos testados. Como sua principal ação é interferir na respiração celular, ligando-se às proteínas, as células demoram mais tempo para morrer, com isso a desestabilização da estrutura do biofilme é mais demorada (Burk, 1984).

Em contrapartida, o microbicida mais eficiente na erradicação dos biofilmes formados nas cinco superfícies foi o FBP-183, para o qual a concentração de erradicação do biofilme foi 50 vezes (5,0%) a concentração indicada pelo fabricante para preservar a emulsão óleo/água. Isto se deve à presença dos ativos triazina e piritionato de sódio na sua formulação.

O segundo biocida mais eficaz na erradicação dos biofilmes formados nas

superfícies dos cinco materiais testado foi o BP-180 (solução de triazina a 80% em água), tendo sido necessária a utilização da concentração de 9,0% (90 vezes a concentração de uso). O emprego desta concentração menor que a de 100 vezes a concentração indicada pelo fornecedor foi avaliada, pois a diminuição da população microbiana nas superfícies já com a concentração de 50 vezes a de uso foi maior em relação aos demais microbicidas testados.

A eficácia destes dois antimicrobianos pode ser devida ao fato de que os seus mecanismos de ação estão diretamente ligados à liberação de formaldeído. O formaldeído é uma molécula altamente eficaz no controle de micro-organismos, apesar de sua toxicidade, pois envolve reações de alquilação de proteínas e ácidos nucleicos (Schwingel e Eachus, 2009), além de agir na parede celular, causando lise e morte imediata da célula (Burk, 1984), desestruturando o filme, o que facilita sua permeação através das “torres de cogumelo” do biofilme (Figura 4). Destaca-se que o BP-509 tem ação lenta, pois atua no DNA celular, tendo efeito residual, sendo esperada eficácia de eliminação em períodos mais longos de exposição.

Neste estudo não foi possível observar se houve interferência do material de construção das partículas na ação do biocida sobre os biofilmes formados, pois as concentrações utilizadas foram pré-definidas baseadas em outros estudos (Lucchesi, 2006; Capelletti, 2006). Para verificar a interferência exata dos materiais testados na erradicação dos biofilmes seria necessário testar concentrações intermediárias entre a concentração de uso e as concentrações encontradas para a erradicação.

Nas concentrações de erradicação testadas, a quantidade de moléculas de ativo disponível foi mais que suficiente para erradicar as células microbianas e desestruturar o biofilme. Em teoria, pode-se supor que a estrutura formada pelos micro-organismos inerentes a cada processo seja única e que possua comportamento similar quando madura. Porém deve-se levar em consideração que além da possibilidade das interações material-célula serem diferentes, os mecanismos de ação dos agentes microbianos também se diferenciam entre os diferentes suportes que foram utilizados.

Para verificação desta hipótese foi realizado um teste de susceptibilidade com uma concentração inferior à de erradicação. Para estes ensaios utilizou-se

concentração 10 vezes maior que a concentração de biocida indicada pelo fabricante para preservar a emulsão. Como os testes anteriores mostraram que esta é uma dosagem de antimicrobiano insuficiente para erradicação dos biofilmes formados nas superfícies dos cinco materiais testados, esta situação intermediária foi escolhida para verificar se a superfície de crescimento teria influenciado a diminuição da população microbiana do biofilme formado.

A população microbiana inicial dos biofilmes aderidos às superfícies variou de $1,7 \times 10^8$ UFC/g para o aço inoxidável a $7,0 \times 10^8$ UFC/g para o aço carbono, equivalendo a $2,34 \times 10^6$ UFC/cm² e $9,18 \times 10^6$ UFC/cm², respectivamente. Nestes ensaios (Figura 31) as concentrações testadas não erradicaram os biofilmes, apenas ocorrendo a morte celular numa parte da população aderida. Porém, pode-se observar que o tipo de material utilizado como suporte dos biofilmes interferiu na morte celular, pois para os cinco biocidas testados a diminuição da população dos biofilmes formados em aço carbono foi inferior à verificada nos demais materiais. O número de indivíduos presentes nos biofilmes fixados em aço carbono decaiu menos de uma unidade logarítmica, ou seja, a população passou somente de $7,0 \times 10^8$ UFC/g ($2,34 \times 10^6$ UFC/cm²) para $1,5 \times 10^8$ UFC/g ($1,96 \times 10^6$ UFC/cm²).

A maior redução populacional foi observada para os biofilmes formados nas partículas confeccionadas em vidro e aço inoxidável, nos quais a população foi reduzida em 99,99%, ou seja, de uma população de $3,7 \times 10^8$ UFC/g ($1,53 \times 10^6$ UFC/cm²) e $5,1 \times 10^8$ UFC/g ($7,03 \times 10^6$ UFC/cm²), respectivamente, para uma população de $2,0 \times 10^4$ UFC/g ($8,3 \times 10$ UFC/cm²) para o vidro, e de $2,5 \times 10^4$ UFC/g ($2,7 \times 10^2$ UFC/cm²) para o aço inoxidável.

Estes resultados são condizentes com os dados obtidos no teste de hidrofobicidade e intensidade de brilho, porém contradizem nos resultados de área superficial e de tamanho de poro. Os resultados com PVC e alumínio mostram uma redução intermediária em relação aos observados nos demais materiais, o que leva a concluir que quando não se tem moléculas de antimicrobianos suficientes para erradicar toda a população celular, as interações de van der Waals, o equilíbrio eletrostático na interface célula-substrato e a hidrofobicidade das superfícies (Boonaert

et al., 2001) podem interferir diretamente no resultado da eficácia do microbicida.

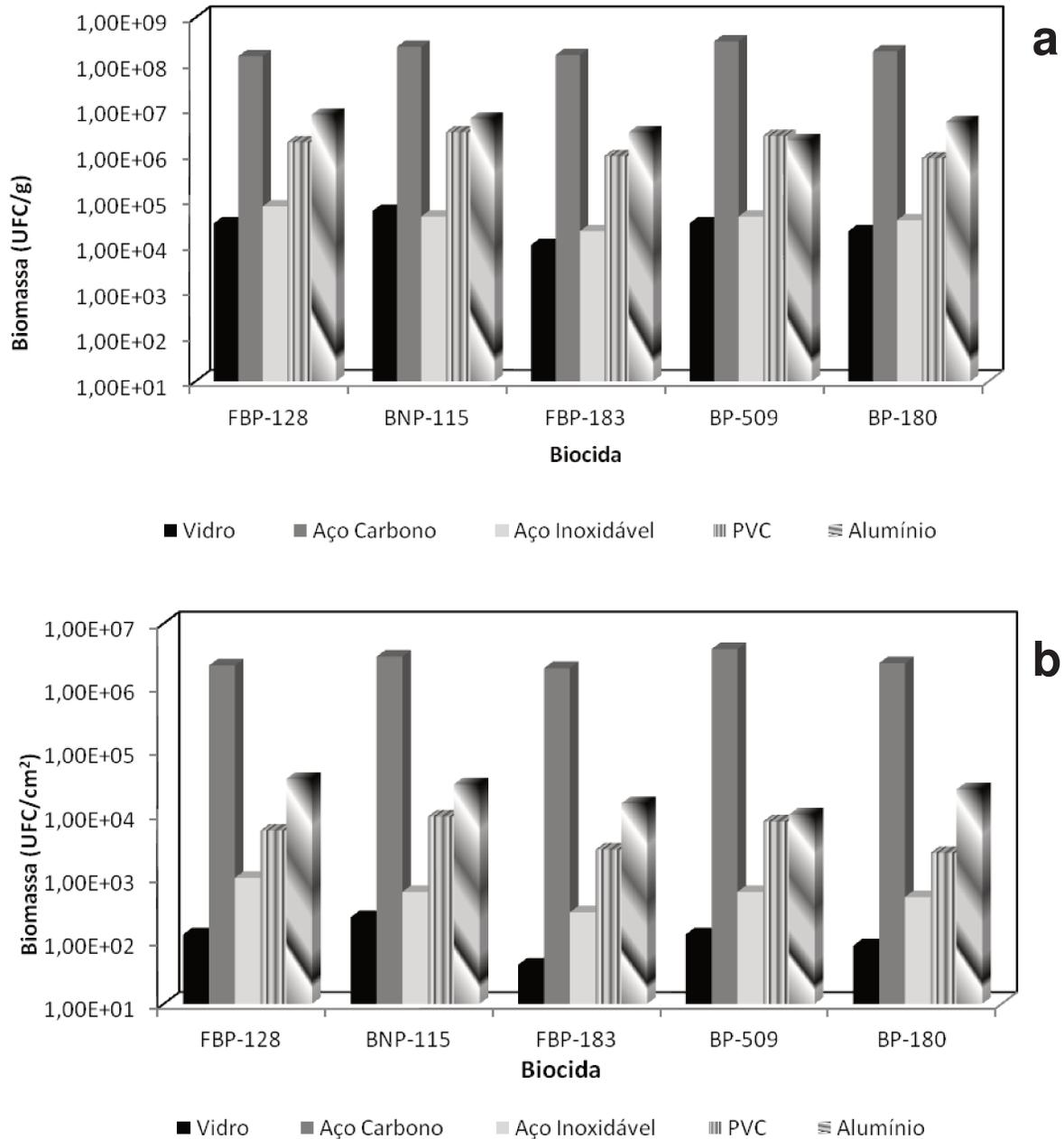


Figura 31: Susceptibilidade dos biofilmes formados na superfície dos materiais aos microbicidas com 10 vezes a concentração indicada pelo fabricante em termos da variação da concentração celular por massa do material (a) e por área superficial (b).

Os mecanismos de ação e a capacidade dos antimicrobianos de permear a estrutura do filme são também fatores que interferem na ação dos biocidas. Infelizmente, não se dispõe de muitos dados sobre os mecanismos de ação dos biocidas industriais em biofilmes nativos, com os quais se possa comparar os resultados aqui descritos, talvez pelo fato de não se utilizar tais moléculas puras e sim uma mistura de ativos, que interagem de forma sinérgica aumentando sua eficácia (Zago *et al.*, 2009 e Lambert *et al.*, 2003).

5.8. Determinação da concentração residual mínima de biocida para retardar ou impedir a formação do biofilme em lâminas de diferentes materiais.

Neste ensaio, foram efetuadas algumas modificações em relação aos testes anteriores. Os corpos de prova em forma de esferas foram substituídos por lâminas confeccionadas com os mesmos materiais utilizados nas partículas. A tensão de cisalhamento foi propiciada pela recirculação da fase líquida, com o intuito de se reproduzir as condições existentes na empresa que forneceu o fluido de corte, empregando um suporte com um formato que facilite a análise.

Nesta parte do estudo, o objetivo foi determinar a concentração mínima residual de biocidas para impedir ou retardar a fixação e proliferação de biofilmes microbianos, em sistema contínuo, utilizando a emulsão óleo/água contaminada. Existem diversas variáveis que afetam a taxa de reposição da emulsão óleo água no sistema (ou têm papel na sua definição). Algumas destas variáveis são, por exemplo, a demanda de produção, o número de turnos trabalhados, a geometria da peça, o tipo de operação, o tipo de arraste dos cavacos formados, a formação dos cavacos, vazamentos, dentre outros. Estes fatores dificultam a generalização de uma taxa de reposição da emulsão; por este motivo a taxa de reposição deste estudo foi definida com base naquela tradicionalmente efetuada na empresa que foi estudada.

Os resultados obtidos estão indicados na Figura 32 para o ensaio da primeira etapa deste protocolo, onde se mostram os resultados das contagens dos micro-organismos recuperados de cada superfície em cada período de coleta, na ausência de biocidas. A população microbiana no seio do líquido variou de $6,2 \times 10^6$ UFC/mL a $8,3 \times$

10^9 UFC/mL durante os 15 dias de ensaio.

A população microbiana recuperada dos biofilmes formados até o 5º dia de ensaio chegou a 10^6 UFC/cm²; do 6º ao 15º dia, a população total de bactérias foi sempre superior a 10^7 UFC/cm², chegando a 10^{10} no último dia (vidro e aço carbono), enquanto que a população quantificada na emulsão não ultrapassou a marca de 10^9 UFC/mL.

A fixação e proliferação dos micro-organismos é muito rápida e pode-se considerar que todos os biofilmes já estavam maduros até o final da primeira semana de experimento, ou seja, com população microbiana superior a 10^6 UFC/cm² (Marques e Manfio, 2004).

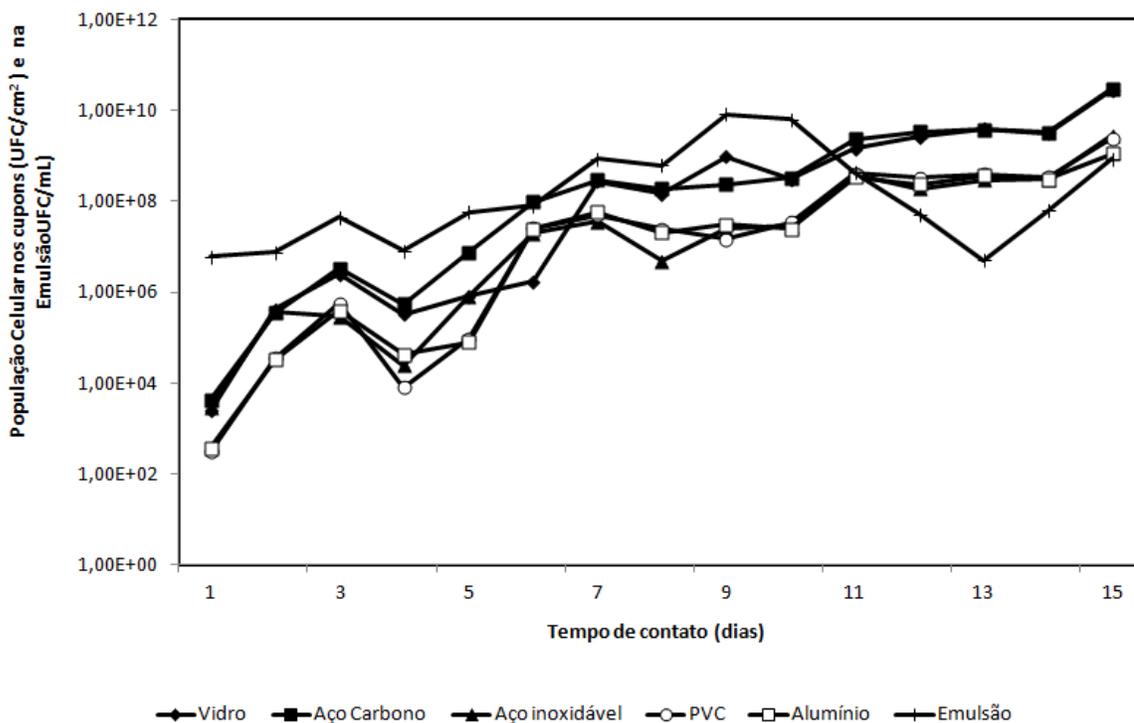


Figura 32: Resultados da recuperação microbiana dos biofilmes formados na superfície das lâminas de aço carbono, aço inoxidável, alumínio, PVC e vidro.

Estes resultados confirmam os dados obtidos no item 5.4, onde a população aderida na superfície das partículas com realimentação da emulsão tende a aumentar

continuamente nos casos em que há uma reposição contínua de nutrientes no sistema, na qual o cisalhamento promovido pelo fluido é insuficiente para desprender o filme por turbilhonamento. Já a população bacteriana na emulsão sofre uma redução antes de um posterior aumento até a obtenção do pico, que ocorre no 10^o dia, mesmo com a reposição de emulsão, possivelmente pela limitação de algum nutriente no sistema, ou pela adaptação natural da microbiota mista às mudanças nutricionais, que ocorre como parte de um processo natural nestas populações.

Estes resultados comprovam as afirmações feitas por Passman (1988, 1992 e 1997) quanto à necessidade de controlar a população microbiana nos fluidos de corte. No entanto, é necessário determinar a concentração residual mínima de biocida no sistema para retardar ou inibir a proliferação descontrolada. Porém, esta concentração residual mínima não deve ser generalizada para todos os casos, pois alguns aspectos que devem ser considerados variam de sistema para sistema, tais como: a taxa de reposição (ou evaporação) da emulsão, a qualidade da água utilizada para a formulação da emulsão, a demanda da produção, o tipo de sistema (aberto, fechado), a ocorrência de vazamentos, o tipo de material a ser cortado.

Para a execução da segunda e da terceira etapa do procedimento utilizou-se o biocida BP-180, pois além de ter sido o que apresentou a segunda melhor desempenho (item 5.7), possui o menor custo e o seu princípio ativo, a triazina, é um dos preservantes mais utilizados no sistema de usinagem de metais (Schwingel e Eachus, 2009) para controle da população microbiana na emulsão.

A reposição do BP-180 foi efetuada a 0,1% e 0,2%, em experimentos separados, e sempre em relação ao volume total da emulsão (20 litros), totalizando respectivamente o equivalente a 800 e 1600 ppm do ativo puro. O residual de triazina foi medido na emulsão no mesmo período da amostragem das lâminas.

Os resultados do ensaio com adição de 0,1% do BP-180 mostraram que a dosagem não foi suficiente para impedir a formação do biofilme. A dosagem residual de triazina nestas amostras foi sempre inferior a 700 ppm, indicando que este residual não impede ou retarda a formação de biofilme na superfície das lâminas, como mostra a Figura 33.

A população microbiana no seio do líquido com o residual de triazina variou de $2,0 \times 10^6$ a $9,2 \times 10^7$ UFC/mL.

Conforme já comentado, para os biofilmes serem considerados maduros e resistentes, a população microbiana deve estar acima de 10^6 UFC/cm² (Marques e Manfio, 2004). Neste ensaio verificou-se que o tempo necessário para a maturação foi quatro vezes superior se comparado ao teste padrão do 1º dia (Figura 32, Tabela 21). Estes resultados indicam que a menor população no seio do líquido e a ação do microbicida nas células mais externas (teoricamente mais susceptíveis) dificultaram e/ou retardaram a adesão celular, porém não impediram a sua adesão e proliferação nos biofilmes, já que no 16º dia a contagem microbiana foi superior a 10^9 UFC, indicando que o residual de triazina para impedir a formação do biofilme deve ser superior a 700 ppm.

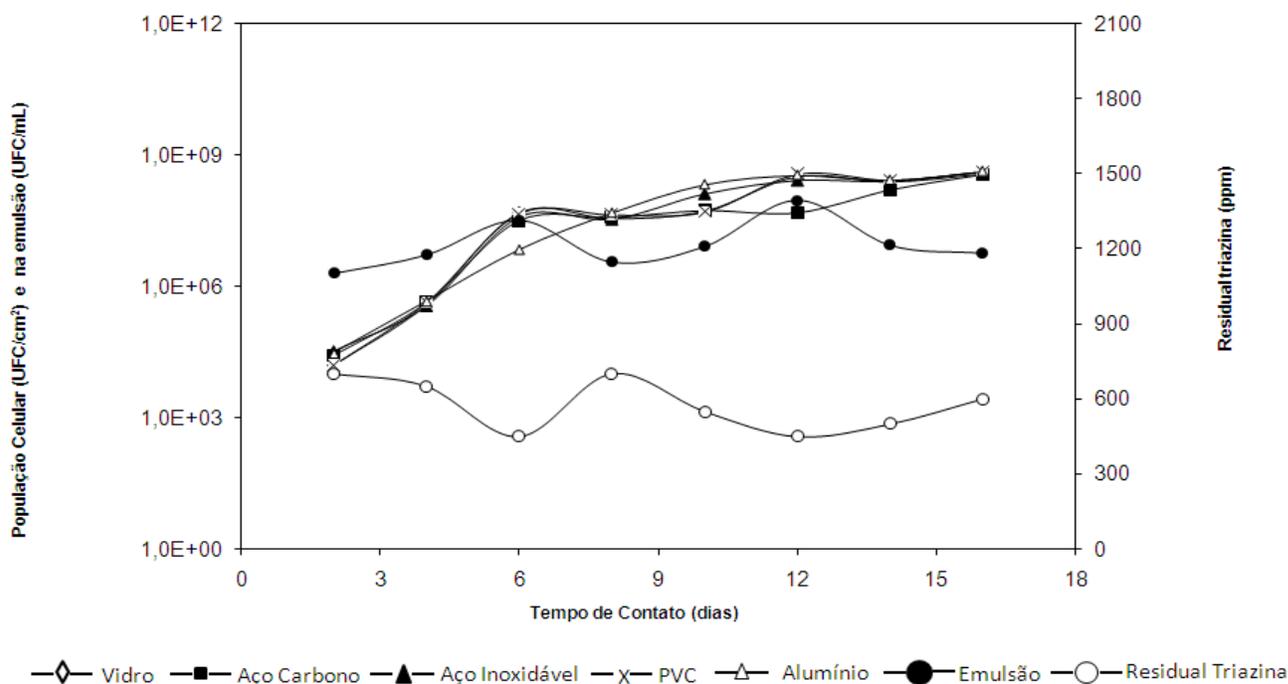


Figura 33: Resultados da recuperação da população microbiana dos biofilmes e do residual de triazina no sistema com 0,1% de microbicida.

Os resultados do ensaio no qual a dosagem do BP-180 foi de 0,2% (v/v) na emulsão reposta mostraram que durante todo o ensaio o residual de triazina foi superior

a 1.000 ppm, dificultando a proliferação dos biofilmes nas cinco superfícies testadas (Figura 34). Ao longo de 16 dias, as populações microbianas totais recuperadas das lâminas foram inferiores a 100 UFC, o que sugere que a concentração mínima de triazina para impedir a formação rápida de biofilmes deve ser superior a 1.000 ppm ou 0,2% do biocida BP-180 referente ao volume de emulsão reposta.

A população microbiana no seio do líquido, com adição de 0,2% BP-180 durante os 16 dias de ensaio variou entre $3,0 \times 10^2$ a $4,2 \times 10^4$ UFC/mL.

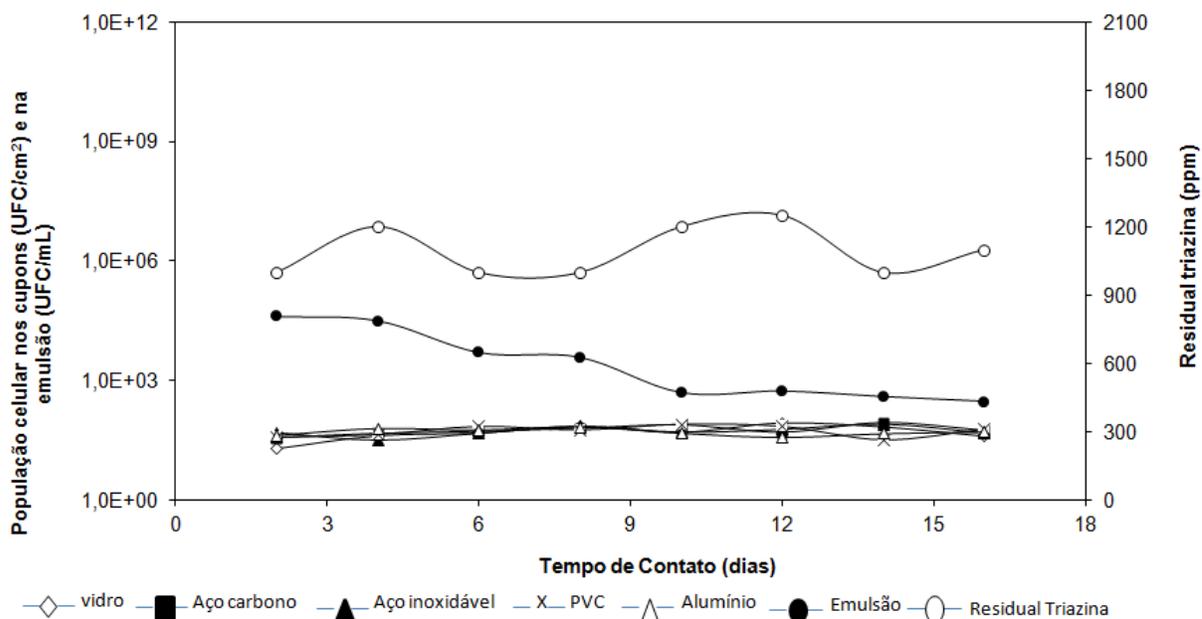


Figura 34: Resultados da recuperação da população microbiana dos biofilmes e do residual de triazina no sistema com 0,2% de microbicida.

Observou-se então, a partir destes ensaios, que no sistema sem adição do biocida, os biofilmes formados em cada uma das cinco superfícies proliferam enquanto há nutrientes, oxigênio e cisalhamento em nível ideal. As diferentes superfícies não interferem no tempo de adesão e de proliferação dos biofilmes, pois os resultados das recuperações celulares foram semelhantes entre si.

A adição de 0,1% de BP-180 a cada reposição de emulsão recém-diluída e com baixa contaminação mostrou que o residual de 700 ppm de triazina não foi suficiente para impedir a proliferação dos biofilmes nas superfícies testadas, mas apenas houve

um retardamento na maturação destes biofilmes (Figura 33).

Quando se adiciona, alternativamente, 0,2% de BP-180 a cada reposição de emulsão recém-diluída e com baixa contaminação, notou-se que o residual obtido de 1.000 ppm de triazina é suficiente para manter a população microbiana controlada, tanto no seio do líquido ($3,0 \times 10^2$ UFC/mL a $4,2 \times 10^4$ UFC/mL) quanto nos biofilmes (abaixo de 100 UFC/cm²) (Figura 34 e Tabela 23).

5.9. Determinação da concentração de choque necessária para erradicar os biofilmes formados na superfície dos corpos de prova

Nas indústrias de óleo de corte é comum praticar três aplicações de biocida em dias consecutivos, aproximadamente nos mesmos horários, nos sistemas contaminados, ou seja, uma adição a cada 24 horas por três dias seguidos. Esta estratégia, denominada “dosagem de choque”, é utilizada para a erradicação do biofilme já estabelecido. Esse procedimento tem-se mostrado eficaz em mais de 90% das vezes em que é efetuado. Este ensaio visou à validação *in vitro* da eficácia deste tratamento.

Como uma prática industrial de tratamento antimicrobiano adotado no segmento de fluido de corte, quando o pH fica abaixo de 4,0, acompanhado pela perda do teor de óleo na emulsão, com ou sem a presença de odor forte (de enxofre, fezes, fermentação, dentre outros), efetua-se uma coleta do fluido para análise da população microbiana em laboratório, através de diluição seriada e plaqueamento em profundidade em meio de cultura. Esta avaliação da contaminação microbiana auxilia na escolha do microbicida a ser utilizado. Tem-se verificado que a população microbiana de uma emulsão contaminada é superior a 10^7 UFC/mL. Para realização destes testes utilizou-se o dispositivo descrito no item 4.2.8. A Figura 35 mostra os resultados obtidos nos ensaios.

Com base na demonstração anterior de que não há diferença significativa no comportamento dos biofilmes formados sobre os diferentes materiais utilizados na confecção das lâminas, o aço carbono foi selecionado para suporte teste, por ser o

material mais utilizado na indústria de fluido de corte.

Os resultados de recuperação microbiana da emulsão óleo/água mostraram que a estratégia de choque mantém a população microbiana inerente ao sistema fabril sob controle, mesmo após 24 horas da terceira adição (72 horas). Este comportamento se repete na formação do biofilme, ou seja, a população microbiana diminui progressivamente até não mais se verificar recuperação microbiana pelo método utilizado.

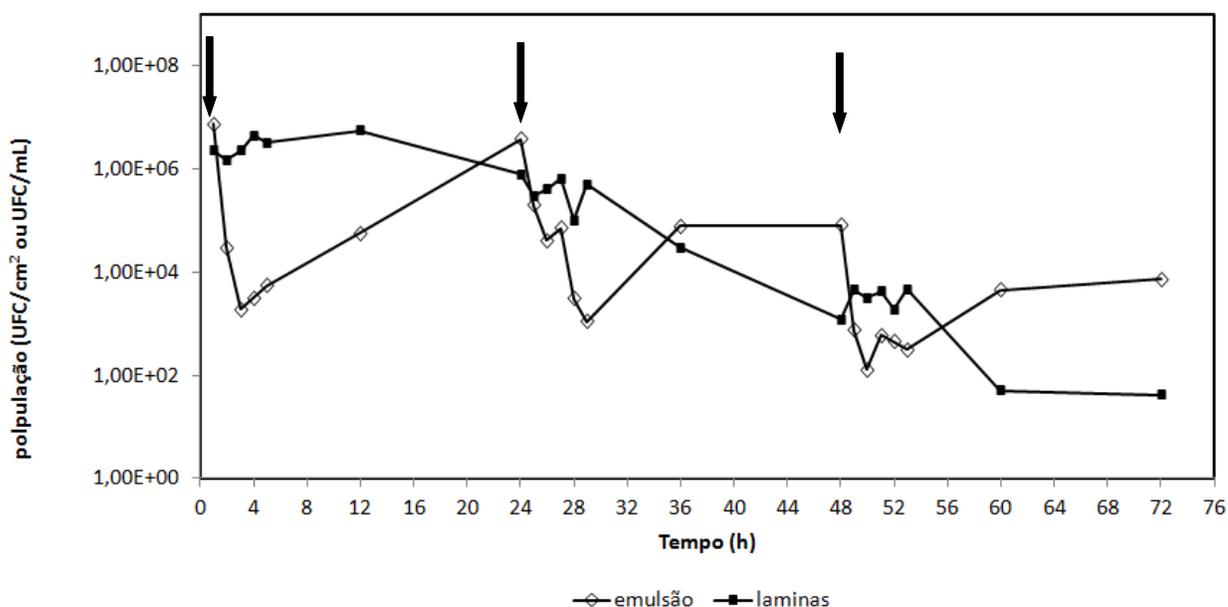


Figura 35: Resultados da recuperação microbiana na emulsão óleo/água e dos biofilmes formados na superfície das lâminas de aço carbono após o uso da estratégia de choque (por 3 dias consecutivos). As setas indicam os momentos de adição dos biocidas BP-509 e FBP-128, ambos em concentrações de 0,2% (v/v).

Estes resultados mostram que biofilmes nativos podem ser controlados com a estratégia de choque e com a manutenção do residual de antimicrobiano a um nível que impeça e/ou iniba a formação de biofilmes. Para aplicação dos resultados destes ensaios na prática industrial, deve-se considerar a importância de se determinar as concentrações dos ativos, tanto a inibitória mínima (para a emulsão), como a

concentração de erradicação mínima (para os biofilmes), na tentativa de impedir que ocorra a adaptação da microbiota com micro-organismo com maior resistência aos agentes antimicrobianos. Por este motivo, utiliza-se, na prática, microbicidas formulados com agentes antimicrobianos diferentes, preferencialmente com mecanismos de ação distintos (Meyer, 2000).

O sistema escolhido para estudo é bastante complexo, devido à microbiota nativa e mista, inerentes ao processo fabril da indústria de usinagem de metal. Além da escassez de dados na literatura para os estudos sistemáticos sobre assuntos correlatos (micro-organismos nativos inerentes ao processo), a vivência industrial mostra que a grande maioria dos problemas de contaminação industrial está relacionada à presença de biofilmes resistentes à erradicação, formados a partir da microbiota inerente a cada processo fabril distinto.

As indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, domissanitárias, dentre outras, necessitam de um procedimento rápido, prático e de baixo custo para auxiliar na erradicação destes biofilmes e/ou minimizar os problemas e prejuízos causados por eles.

Os ensaios efetuados neste estudo auxiliaram a minimização e/ou erradicação de biofilmes nativos e resistentes de vários setores industriais, sem a necessidade de se utilizar procedimentos de isolamento e identificação da microbiota, conforme a metodologia tradicional, que além de demorada é de custo elevado.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

No âmbito dos segmentos industriais analisados, concluiu-se que atualmente, um dos materiais mais utilizados para a confecção de instalações e equipamentos industriais é o aço inoxidável, devido às suas muitas vantagens. Exceções são observadas no segmento de óleo de corte, que utiliza em sua maioria aço carbono, e no segmento farmacêutico e de produtos químicos especiais, que utilizam, além do aço inoxidável, o vidro para a confecção de reatores e tanques de estocagem especiais.

Com relação a planos de limpeza e sanitização, as indústrias papelarias, farmacêuticas e de cosméticos possuem algum controle e validação de seus procedimentos de limpeza. Os demais segmentos estão começando a adquirir conhecimento, bem como a consciência da importância econômica, ecológica e de segurança que o controle microbiológico pode propiciar, seja este controle por adição de antimicrobianos ou por procedimentos de limpeza e sanitização de equipamentos e nas áreas fabris.

Quando analisados os dados dos ensaios isolados de caracterização das superfícies verificou-se que não houve resultados que confirmassem um material como incondicionalmente mais susceptível à adesão microbiana que os demais. A comparação simultânea dos dados de intensidade de brilho, morfologia da superfície, hidrofobicidade, área superficial, volume e tamanho de poros permitiu inferir que o aço inoxidável, o vidro e o PVC teriam menos características favoráveis à adesão microbiana.

A caracterização do fluido de corte testado mostrou grande diversidade na microbiota, com predominância do grupo de bactérias heterotróficas totais.

A formação de biofilmes a partir da emulsão óleo/água naturalmente contaminada em todas as cinco superfícies foi semelhante, indicando que quando o inóculo é formado por uma cultura mista, adaptada ao sistema, o fator que regula a adsorção, fixação e a posterior proliferação celular não é necessariamente o tipo de

superfície e sim a própria característica da população presente no sistema em questão, aliado ao tempo que os micro-organismos permanecem em contato com os seus nutrientes (incubação).

A Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou semelhanças e diferenças na formação do biofilme a partir do óleo de corte naturalmente contaminado em diferentes materiais, embora quanto à fixação, proliferação, maturação e susceptibilidade a biocidas, todos os biofilmes, independentemente da superfície, se comportaram de maneira similar.

Em todas as superfícies foi possível observar a fixação de bastonetes a partir de 6 horas de incubação, o que não significa que estes não estivessem presentes antes. Segundo os resultados de DGGE a população no tempo de incubação de 6 horas seria uma transição da população presente entre 1h e 24 horas (Figura 25). Com exceção do aço inoxidável e do vidro, a população microbiana dos biofilmes aumentou com o tempo de incubação, resultados corroborados pelo ensaio de DGGE.

A EPS possui morfologia diferente dependendo da superfície, ou seja, EPS formadas nas partículas de alumínio têm forma de uma rede fibrosa (porosa), enquanto que a de aço carbono e aço inoxidável têm estrutura mais densa. Na partícula de PVC a morfologia da EPS parece ser um filme viscoso aparentemente homogêneo, enquanto que no vidro não foi possível observar a EPS.

Os resultados encontrados na DGGE corroboram os resultados da formação dos biofilmes nas cinco superfícies nos cinco períodos testados, ou seja, o material de construção dos corpos de prova não afetou a formação do biofilme, entretanto o tempo de incubação foi significativamente importante para a fixação da comunidade. Mediante estes resultados, pode-se inferir que no processo fabril, o material de construção de equipamentos, tubulação e utensílios não interfere diretamente na fixação dos micro-organismos pioneiros, porém o tempo de contato entre a população e os nutrientes é de suma importância para o desenvolvimento e maturação dos biofilmes industriais.

Quanto aos ensaios de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, pôde-se observar que a interferência dos materiais utilizados como suporte só pode ser verificada quando se utiliza concentração inferior à mínima de erradicação. A princípio, biofilmes formados por micro-organismos nativos (inerentes ao processo fabril),

consequentemente com maior resistência a intempéries devido à adaptação, podem se fixar e iniciar a proliferação independentemente da superfície, apresentando um comportamento muito diferente daquele observado nos biofilmes formados a partir de culturas puras.

Os ensaios efetuados com os corpos de prova em forma de lâminas, para a determinação da concentração residual mínima, mostraram que para este sistema, a adição de 800 ppm do ativo (0,1% BP-180) reduziu a população microbiana na emulsão e retardou a maturação dos biofilmes nas cinco superfícies, porém não foi suficiente para impedir a instalação do biofilme. No entanto a dosagem de 0,2% do BP-180, que possibilitou a manutenção de um residual mínimo entre 1000 e 1200 ppm de ativo, foi suficiente para: 1) controlar adequadamente a população microbiana no fluido, 2) reduzir a população microbiana dos biofilmes a níveis inferiores a 100 UFC/cm² e 3) impedir sua maturação.

Os resultados do ensaio utilizando-se a dosagem de choque, com tripla adição em períodos seqüenciais do microbicida, comprovaram que o procedimento normalmente utilizado na indústria de usinagem é eficaz, pois a tripla dosagem permitiu manter a população microbiana controlada por um período superior a 72 horas após a última adição.

6.2. Sugestões para trabalhos futuros

As sugestões para trabalhos futuros baseiam-se nas limitações observadas ao longo deste trabalho e na necessidade de se verificar se os resultados obtidos se aplicam a outros segmentos de mercado. Assim, sugere-se:

1. Identificação molecular da população microbiana presente nos biofilmes formados nas diferentes superfícies a partir do fluido de corte contaminado, determinando as populações pioneiras, as secundárias e as espécies que sinalizam a maturação do biofilme.
2. Efetuar teste de susceptibilidade a microbicidas para verificar a exata

concentração de biocida necessário para erradicar os biofilmes formados nas diferentes superfícies a partir do fluido de corte contaminado.

3. Aplicar a metodologia de formação de biofilmes e de sua susceptibilidade a microbicidas em outros segmentos industriais.
4. Fazer um estudo similar em ambientes mais hostis, como a linha de água ultra-pura para aplicação farmacêutica, águas WFI (para injeção), etc.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison, D.G. – The biofilm matrix. - Biofouling. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 19, 139-150, 2003.
- Allsopp, D.; Seal, K. e Gaylarde, C. – Introduction to Biodeterioration. – Editora Cambridge University Press, 2º Edição, cap. 01, 01-10, 2004.
- American Society for Testing and Materials - ASTM D523 – 89 Standard Test Method for Specular Gloss, 1999.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Resolução RDC nº 59 de 27 de junho de 2000. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15279&word>. Último acesso em Julho de 2011.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Resolução - RDC nº 210 de 04 de agosto de 2003. Disponível em https://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/210_03rdc.pdf. Último acesso em Julho de 2011.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Resolução RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/275_02rdc.htm. Último acesso em Julho de 2011.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Portaria nº 348, de 18 de agosto de 1997. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=7315>. Último acesso em Julho de 2011.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Portaria nº 368, de 4 de setembro de 1997. Disponível em http://www.cn3.com.br/legislacao/portaria_n_368_de_04_de_setembro_de_1997__mapa/43. Último acesso em Julho de 2011.
- Araújo, E.A.; Andrade, N.J.; Carvalho, A.F.; Ramos, A.M.; Silva, C.A.S. – Aspectos da adesão de micro-organismos. Química Nova 33 (9), 1940-1948, 2010.
- Associação Brasileira de Alumínio – disponível em <http://www.abal.org.br>. Último acesso em Julho de 2011.

- Associação Técnica Brasileira das Indústrias Automáticas e de vidro (ABIVIDRO) – disponível em <http://www.abvidro.org.br>. Último acesso em Novembro de 2010.
- Azeredo, J.; Oiveira, R. – The role of hydrophobicity and exopolymers in initial adhesion and biofilm formation. In: LENS, P. et al. (Ed.) Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology: characteristics, analysis and control. London: IWA Publications, cap. 2, 16-31, 2003.
- Bayoudh, S.; Othmane, A.; Bettaieb, F.; Bakhrouf, A.; Ouada, B.; Ponsonnet, L. – Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrofobic and hidrofilic substrate. *Materials Science and Engineering*. 26 (2-3), 300-305, 2006.
- Biocidal Products Directive, Borderline between directive 98/8/EC concerning the placing the market of biocidal product and directive 76/768/EEC concerning cosmetics products. DOC – Biocides – 2002/03 rev 1, 2007.
- Bassler, B.L. – Cell-to-cell communication in bacteria: a chemical discourse. *Harvey Lectures*. 2004-2005; 100: 123-142, 2006.
- Brasquip Ambiental S.A. – Setor de Segurança Ambiental – Comunicação Pessoal, 2009.
- BYK Gardner – Literatura técnica do equipamento Micro-Tri-gloss, São Paulo, 2006.
- Boari, C. A.; Alves, M.P.; Tebaldi, V. M. R.; Savian, T. V.; Piccoli, R. H. - Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 29, n. 4, 886-895, 2009.
- Boonaert, C. J. P.; Dufrière, Y. F.; Derclaye, S. R.; Rouxhet, P.G. – Adhesion of *Lactococcus lactis* to model substrata: direct study of the interface. *Colloids and Surfaces*, 22, 171-182, 2001.
- Burk, J.M. - Slime control seminar. Buckman Laboratories Incorporation, Campinas, São Paulo, Brasil, 1984.
- Callister, W.D. – Ciências e Engenharia de Materiais - uma Introdução. Editora LTC – 5ª Edição, 589 p., 2002.

- Camilli, A.; Bassler, B.L. – Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311, 1113-1116, 2006.
- Capelletti, R.V. – Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.
- Center for Biofilm Engineering – New discoveries. Montana State University. Disponível em <http://www.erc.montana.edu>. Último acesso em setembro de 2011.
- Ceri, H.; Olson, M.E.; Stremick, C.; Read, R.R.; Morck, D.; Buret, A. – The Calgary Biofilm Device: A new technology for the rapid determination of antibiotic susceptibility of bacterial biofilms. *Journal Clinical Microbiology*, 37 (6), 1771-1776, 1999.
- Ceri, H.; Morck, D.W.; Olson, M.E. – Biocide susceptibility testing of biofilms. In: Block, Seymour S.- *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Editora Lippincott Williams & Wilkins 5^ª ed., capítulo 75; 1429-1437, 2001.
- Cha, C.; Gao, P.; Chen, Y.C.; Shaw, P.D.; Farrand, S.K. – Production of acyl-homoserine lactone Quorum Sensing signals by Gram negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 1119-1129, 1998.
- Chaves, L.C.D. – Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável. Dissertação de mestrado, Universidade do Ninho, 2004.
- Chen, H. e Fink, G.R. – Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development*. 20, 1150-1161, 2006.
- Christensen, B.E.; Characklis, W.G. – Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis, W.G., Marshall, K.C. *Biofilms*. Editora John Wiley and Sons, Inc, 93-130, 1990.
- Cloete, T.E. – Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Internacional Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 277-282, 2003.

- Costerton, J.W.; Geesey, G.G.; Cheng, K.J. – How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86-95, 1978.
- Costerton, J.W.; Cheng, K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta M.; Marrie, T.J. – Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews of Microbiology*, 41, 435-464, 1987.
- Costerton, J.W.; Lappin-Scott, H.M. – Behaviour of bacteria in biofilm. *ASM News*, 55, (12), 650-654, 1989.
- Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.E.; Korber, D.R.; Lappin-Scott H.M. – Microbial biofilms. In Oenston L. N., Balows A. and Greenberg E. P. *Annual Reviews of Microbiology*, 49, 711-745, 1995.
- Costerton, J.W. e Wilson, M. – *Introducing Biofilms*. Editorial de Cambridge University Press, *Biofilms*, 1, 1-4, 2004.
- Colorado Boulder Applied Mathematical Biology Group – MBW: Role of biofilm in structural development. University of Colorado Boulder. Disponível em http://mathbio.colorado.edu/mediawiki/index.php/MBW:Role_of_Biofilm_Matrix_in_Structural_Development. Último acesso em Setembro de 2011.
- Denyer, S.P.; Stewart, G.S.A.B. – Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 261-268, 1998.
- Denkhaus, E.; Meisen, S.; Telgheder, U.; Wingender, J. – Chemical and physical methods for characterization of biofilms. *Microchimica Acta* 158, 1-27, 2007.
- Dolan, R.M. – Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890, 2002.
- Drenkard, E. – Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and infection*, 5, (3), 1213-1219, 2003.
- Dunlap, P.V.; Greenberg, E.P. – Control of *Vibrio fischeri* lux gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-LuxR protein regulatory circuit. *Journal of Bacteriology* 170, (9), 4040-4046, 1988.

- Eberhard, A.; Burlingame, A.L.; Eberhard, C.; Kenyon, G.L.; Nealson, K.H.; Oppenheimer, N.J. – Structural Identification of the Autoinducer of *Photobacterium fischeri* Luciferase. *Biochemistry*, 20, 2444-2449, 1981.
- Engelbrecht, J.; Nealson, K., e Silverman, M. – Bacterial bioluminescence, isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 32, 773-781, 1983.
- Elvers, K.T.; Lappin-Scott, H.M. – Biofilms and biofouling. *Encyclopedia of Microbiology* 1, 478-485, 2000.
- EPA – U.S Environmental Protection Agency - Fact Sheet: Dry (Non-Solvent) Cleaning for Industrial Cleaning – disponível em <<http://es.epa.gov/techinfo/facts/florida/dryclfs.html>>. último acesso em Julho de 2011.
- Erner, B.; Douglas, L. – Correlation between cell-surface hidrofobicity of *Candida albicans* and adhesion to bucal epithelial cells. *FEMS*, 78 (37), 37-42, 1992.
- Flemming, H.C.; Wingender, J. – Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilm construction material. In Weber, J., W. *Biofouling and Materials, Workshop*, 2-18, 1999.
- Flemming, H.C.; Wingender, J. – The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633, 2010.
- Fletcher, M.; Loeb, G.I. – Influence of substratum characteristics on the adhesion on the attachment of a marine *Pseudomonas* to solid surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 67-72, 1979.
- Fletcher, M. – Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance – *Journal Bacteriology*, 170, 2027-2030, 1988.
- Fogo, F. C – Avaliação e critérios de eficiência nos processos de tratamento de fluido de corte por eletroflotação. – Dissertação de mestrado do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2008.

- Gilbert, P.; Das, J.R.; Jones, M.V. Allison, D.G. – Assessment of resistance towards biocides following the attachment of microorganisms to, and growth on, surface. – *Journal of Applied Microbiology*, 91, 248-254, 2001.
- Guy, A.G. – *Ciência dos Materiais – Tradução de José Roberto G. da Silva – RJ – Livros técnicos e científicos – SP, Editora Universidade de São Paulo, 435 p, 1980.*
- Hardman, A.M.; Stewart, G.S.; Williams, P. – Quorum Sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 74, 199-210, 1998.
- Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E.M.H. – Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3233-3241, 1997.
- Hornby, J.M.; Jensen, E.C.; Lisec, A.D.; Tasto, J.J.; Jahnke, B.; Shoemaker, R. - Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2982-92, 2001.
- Instituto do PVC – O PVC. Disponível em http://www.institutodopvc.org/publico/?a=conteudo&canal_id=39&subcanal_id=43. Último acesso Julho de 2011.
- Jahn, A.; Griebe, T.; Nielsen, P.H. – Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling*, 14 (1), 49-57, 1999.
- Klemm, P.; Vejborg, R.M.; Hancock, V. – Prevention of bacterial adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88, 451-459, 2010.
- Kasnowski, M. C.; Mantilla, S. P. S.; Oliveira, L. A. T.; Franco, R. M. – Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina*, 15, 1-23, 2010.
- Lambert, R.J.W.; Johnston, M.D.; Hanlon, G.W.; Denyer, S.P. - Theory of antimicrobial combinations: biocide mixtures – synergy or addition? *Journal of Applied Microbiology*, 94 (4), 747–759, 2003.

- Leadbetter, J.R.; Greenberg, E.P. – Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology*, vol 182, (124), 6921-6926, 2000.
- Lennox, J.E.; Douthwright, J.; Delisle, G.; Eidemiller, B. – Biofilms : Online Manual - 2006. Disponível em <http://www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms>. Último acesso Julho de 2011.
- Li, B.; Logan, B.E. – Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces*, 36, 81-90. 2004.
- Little B, Wagner, P.; Ray, R.; Pope R, – Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 213-222, 1991.
- Locatelli, C.I.; Englert, G.E.; Kwitko, S.; Simonetti, A.B. – Aderência bacteriana in vitro a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, São Paulo, v. 67, (2), 241-148, 2004.
- Lorite, G.S. – Identificação de processos físico-químicos na adesão e desenvolvimento de biofilmes da bactéria *Xylella fastidiosa*. Tese de Doutorado – Instituto de Física Gleb Wataghin, Unicamp, 2011.
- Lucchesi, E.G. – Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e a avaliação de sua susceptibilidade a biocidas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, 2006.
- Lutey, R.W. – Process cooling water. In: Rossmore, H.W. - *Handbook of biocide and Preservative Use*. Editora Blackic Academic & Professional, 51-82, 1995.
- Mattila-Sandholm, T.; Wirtanen, G. – Biofilm formation in the industry: a review. *Food Reviews International*, 8 (4), 573-603, 1992.
- Marshall, K.C.; Stout, R.; Mitchell, R. – Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal General Microbiology*. 68, 337-348, 1971.
- Marshall, K.C. – Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *American Society of Microbiology*. 58, 202-207, 1992.

- Marques, L.L.R.; Manfio, G.P. – Procedimento padrão para determinação de MIC, MBC e MBEC. Workshop em biofilmes microbianos. CPQBA, Unicamp, Campinas, 2004.
- Meyer, B. - Effective disinfectant procedures to prevent the selection of resistant microbes. *Pharmaceutical Technology Europr*, 12 (11), 44–50, 2000.
- Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA) – Portaria nº 368, de 04 de Setembro de 1997. Disponível em http://www.fooddesign.com.br/arquivos/legislacao/portaria_368_97_bpf.pdf. Último acesso em Setembro de 2011.
- Ministério da Saúde – Portaria nº 326 de 30 de julho de 1997. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=100>. Último acesso em Setembro de 2011.
- Ministério da Saúde – Portaria nº 327, de 30 de julho de 1997. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=294>. Último acesso em Setembro de 2011.
- McBain, A.J.; Bartolo, R.G.; Catrenich, C.E.; Charbonneau, D.; Ledder, R.G.; Rickard, A.H.; Symmons, S.A. – Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1), 177-185, 2003.
- Melo, L.F.; Bott, T.R.; Fletcher, M; Capdeville, B. – *Biofilms – Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1994.
- Miyaki, Y.; Fugita, Y.; Minagi, S.; Suginaka, H. – Surface hidrofobicity and adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Microbiology*, 46, 7-14, 1996.
- Monds, R.D.; O’Toole, G.A. – The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17, 73-87, 2009.
- Nascimento, T.; Taveira, N. – Os biofilmes microbianos como agentes causais de doenças humanas. *Biologia S – Revista da Ordem dos Biólogos - Instituto superior de ciências e saúde*, abril 2005. Disponível em <http://www.ordembilogos.pt/Biologias.html>. Último acesso em Agosto de 2011.

- Nealson, K.H., Platt, T. e Hastings, J.W. – Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal Bacteriology*. 104, 313-322, 1970.
- Nikawa, H.; Sadamori, S.; Hamada, T.; Satou, N.; Okuda, K. – Non-specific adherence of *Candida* species to surface-modified glass. *Journal Medical and Veterinary Mycology*. 27(4), 269-271, 1989.
- Oliveira, A.S.; Haully, M.C.O.; Rinaldi, D.A.; Voll, C.E.; Tamanini, C. – Integração Empresa e Universidade no controle de qualidade na agroindústria sucroalcooleira. Universidade Estadual de Londrina - Revista Estação, Ed. 1, 2002. Disponível em http://www.proex.uel.br/estacao/index.php?arq=ARQ_rel&FWS. Último acesso em Setembro de 2011.
- O'Toole, G.; Kaplan, H.B.; Kotler, R. – Biofilm formation as microbial development. - *Annual Review of Microbiology*. 54, 49-79, 2000.
- Panagoda, G.; Ellepola, A.; Samaranayake, L. – Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *APMIS*, 106, 736-742, 1998.
- Pashley, R. M.; Israelachvili, J. N. – DLVO and Hidratation Forces Between Mica Surfaces in Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺ Chloride Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 97, 446-455, 1984.
- Pasmore, M.; Costerton, J.W. – Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30 (7), 407-413, 2003
- Passman, F.J. – Controlling microbial contamination in metalworking fluids. In *Metal Working Fluids*, Society of Manufacturing Engineers, Dearborn, MI. SME Technical Paper MF, 92-127, 1992.
- Passman, F.J. – Biocides for lubricant rancidity and biofouling prevention. *Iron and Steel Engineers*. 74 (10), 41-45, 1997.
- Passman, F.J. – Microbial problems in metalworking fluids. *Journal of the Society of Tribologist and Lubrication Engineers*, 44, 431-433, 1998.

- Passman, F.J., Summerfield, J.; Sweeney, J. – Field Evaluation of a Newly Registered Metalworking Fluid Biocide. *Lubrication Engineering*, 56 (10), 26-32, 2000.
- Pereira, M.O.; Vieira, M.J. – Effects of the interactions between glutaraldehyde and the polymeric matrix on the efficacy of the biocide against *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*. 17, 93-101, 2001.
- Pérez, L.M.; Álvarez, B.L.; Codony, F.; Fittipaldi, M.; Adrados, B.; Penuela, G.; Morató, J. – A new microtitre plate screening method for evaluating the viability of aerobic respiring bacteria in high surface biofilms. *Applied of Microbiology*, 51, 331-337, 2010.
- Ribbe, A. P.; Foldes, A. G.; Corrêa, A.; Hugueneyer C.; Bauer, P.; Reuss, F.; Lichtenfeld, H.; Agosti, G.; Ferreira, J.D.; Spier, L.R.; Ett, R.H.; Grundig W. – *Corrosão e Tratamento Superficiais de Metais*. Editora Associação Brasileira de Metais, 508 p., 1971.
- Roosjen, A., Boksa, N.P., van der Meia, H.C., Busscher, H.J.; Norde, W. – Influence of shear on microbial adhesion to PEO-brushes and glass by convective-diffusion and sedimentation in a parallel plate flow chamber. *Colloids and Surfaces*, 46, 1-6, 2005.
- Runge, P.R.F.; Duarte, G.N. – *Lubrificantes industriais*. Editora Triboconcept – Cotia – SP, 313 p., 1990.
- Sepandj, F., Ceri H., Gibb A. P., Read R. R.; Olson M. E. – Biofilm Infections in Peritoneal Dialysis - Related Peritonitis: Comparison of Standard MIC and MBEC in Evaluation of Antibiotic Sensitivity of Coagulase-Negative Staphylococci. *Peritoneal Dialysis International*, (23), 74-94, 2003.
- Siebert, O.W.; Stoecher II, J.G. – *Materials of Construction*. In Perry, R.H.; Green, D.W. – *Perry's Chemical Engineers – Hand Book*. McGraw-Hill, Inc. Capítulo 28, 1999.
- Sinde, E.; Carballo, J. – Attachment of *Salmonella* SSP e *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor ethylene: the influence of free energy and effect of commercial sanitizers. *Journal Food Microbiology*, 17, 439-447, 2000.

- Siqueira, V. – Cuidados Microbiológicos em Cosméticos e Produtos de Higiene Pessoal. Informativo CRQ-IV – Edição Julho/Agosto 2005. Disponível em http://www.crq4.org.br/informativo/agosto_2005/pagina08.php. Último acesso em Setembro de 2011.
- Souza, M. A.; Pessan L. A. e Rodolfo Jr. A. - Nanocompósitos de Poli(Cloreto de vinila) (PVC)/argilas organofílicas – Scielo – Polímeros, 16, (4), 257-262, 2006.
- Schwingel, W.R.; Eachus, A.C. – Antimicrobial additives for metalworking lubricants – In Lubricant Additives: Chemistry and Applications. Rudnick, LR (ed), 2nd edition, CRC Press, 383-397, 2009.
- Stenstrom, T.A. – Bacterial hydrophobicity an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. Applied and Environmental Microbiology, 55, 142-147, 1989.
- Swift, S.; Winson, M.K.; Chan, P.F.; Baiton, N.J.; Birdsall, M.; Reeves, P.J.; Rees, C.E.D.; Chhabra, S.R.; Hill, P.J.; Throup, J.P.; Bycroft, B.W.; Salmond, G.P.C.; Williams, P.; Stewart, G.S.A.B. – A novel strategy for the isolation of luxI homologues: Evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. Molecular Microbiology, Oxford, 10, 511-520, 1993.
- Takahashi, H.; Suda, T.; Tanaka, Y.; Kimura, B. – Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. Applied of Microbiology, 50, 618-625, 2010.
- Tebecherani, C.T.P. – Aços inoxidáveis. Disponível em http://www.pipesystem.com.br/Artigos_Tecnicos/Aco_Inox/body_aco_inox.html. Último acesso em setembro de 2011.
- Teixeira, P.; Oliveira, R. – Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. Journal of Adhesion Science and Technology, 13, 1287–1294. 1999
- ter Braak, C.J.F.; Smilauer, P. – CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination. Microcomputer Power, Ithaca, NY. 352 p., 2002.

- Teschke, O. – Volume of extracellular polymeric substance coverage of individual *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacterium measured by atomic force microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 67, 312-316, 2005.
- Toassi, R. F. C.; Petry, P. C. - Motivação no controle do biofilme dental e sangramento gengival em escolares. *Revista Saúde Pública*, 36 (5), 634-637, 2002.
- Tortora G., Funk B.; Case C. – *Microbiologia* – Editora Artmed, 6ª edição, capítulo 11, 294-317, 2000.
- Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. – *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association 3ª ed, 1992.
- Van Loosdrecht, M. C. M.; Norde, W.; Lyklema, L.; Zehnder, J. – The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (8), 1893-1897, 1987.
- Vamanu, E.; Vamanu, A.; Popa, D. – Microbial biofilm formation under the influence of various physical-chemical factors. *Biotechnology. & Biotechnological Equipment*, 1993-1996, 2010.
- Videla, H.A. – *Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de materiais*. Editora Edgard Blucher Ltda. – 1ª Edição, 160 p., 2003.
- Vieira, M.J. – Estudo da formação de biofilmes 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 Doutorado. 1995.
- Vinhas, G.M.; Souto-Maior, R.M.; Almeida, Y.M.B. – Estudo de Propriedades de PVC Modificado com Grupos Alquila e Benzila. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15 (3), 207-211, 2005.
- Xavier, J.B. – *Biomatemática – Modelação da estrutura de biofilmes*. *Boletim de Biotecnologia*, 4, 3-13, 2002.

- Zago, J. A. A.; Ushimaru, P. I.; Barbosa, L. N.; Fernandes Junior, A. – Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 9 (4), 828-833, 2009.
- Zinkevich, V.; Hanjansit, L.; Avci, R. – Characterization of conditioning layers formed by exopolymeric substances of *Pseudomonas* NCIMB 2021 on surfaces of AISI 316 stainless steel. *Biofouling* 15, 25-36, 2000.
- Zobell, C.E. – The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46, 39-56, 1943.
- Willis, A.J.; Bott, T.R. – Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* biofilm development by hydrogen peroxide. In: *Understanding heat exchanger fouling and its mitigation*. Congress Ciocco Conference Center. Castelvechio Pascoli, Italy, 1997.
- Wimpenny, J.W.T.; Peters, A.; Scourfield, M.A. – 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, 1993.

APÊNDICE 1

Meios de Cultura

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
Ágar.....	15 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

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
Ágar.....	0,75 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Postgate Medium B, formulado.

Fosfato de Potássio monobásico	0,5 g
Cloreto de amônio	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

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

Tryptic Soy Agar (TSA), Difco.

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

Tryptic Soy Broth (TSB), Difco.

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

Caldo Neutralizante D/E, Difco.

Digerido pancreático de caseína.....	5,0 g
Extrato de Levedura.....	2,5 g
Dextrose.....	10,0 g
Tioglicolato de sódio.....	1,0 g
Tiosulfato de sódio.....	6,0 g
Bissultito de sódio.....	2,5 g
Polissorbato 80 (Tween).....	5,0 g
Lecitina.....	7,0 g
Bromocresol púrpura.....	0,02 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

APÊNDICE 2

Questionário

Nome Empresa:

Fone:

Segmento:

Questionário

1. No processo industrial quais materiais são mais freqüentemente utilizados, em que proporção (%) aproximada e em que tipos de equipamentos?

Material	Proporção (%)	Equipamentos constituídos pelo material
Aço inoxidável		
Aço carbono		
PVC		
Vidro		
Alumínio		
Polietileno		
Outros (especifique):		

2. Na sua opinião, quais os principais pontos críticos de contaminação por micro-organismos na área industrial? Por quê?
3. A empresa possui Procedimentos Operacionais de Limpeza e Desinfecção (SSOP's)? Quais?

APÊNDICE 3

Reagentes Utilizados nos Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura

Soluções para fixação das células para visualização em MEV

1ª fixação em Paraformaldeído 4% / Glutaraldeído 2,5%

1. Dissolver 2g de paraformaldeído em 25 mL de água destilada (agitar sob aquecimento), quando atingir 60°C adicionar NaOH 0,2M até a solução clarear;
2. Deixar esfriar e acrescentar 5 mL de Glutaraldeído para microscopia eletrônica a 25%;
3. Completar para 50 mL com tampão Cacodilato 0,1M a pH 7,2;
4. O material deve permanecer imerso no fixador por no mínimo 1 hora. Após este período o material deve ser lavado 3vezes com tampão Cacodilato 0,1M pH 7,2 gelado, por 15 minutos cada lavagem.

2ª fixação em Tetróxido de Ósmio a 1%

1. Diluir a ampola de 2% em tampão Cacodilato 0,1M pH 7,2 (1:1);
2. O material deve ficar imerso no tetróxido por 15 minutos em geladeira;
3. Após este período o material deve ser lavado em tampão cacodilato 3vezes por 10 minutos cada.

Desidratação em série crescente de álcool

Preparar soluções de 50, 70, 95 e 100% de etanol. O material deve ficar imerso por 15 minutos em cada solução (em ordem crescente de concentração), sendo que a solução 100% deverá ser feita duas imersões.

APÊNDICE 4
Tabelas Referentes aos Gráficos

Tabela A 4.1: Distribuição dos materiais nos sete segmentos industriais pesquisados (Referente aos dados da Figura 8, pagina 69).

	Aço Inoxidável	Aço Carbono	PVC	Vidro	Alumínio	Polietileno	Outros
Domissanitários	62,00%	18,90%	18,90%	0	0	0	0
Cosméticos	55,56%	4,17%	13,89%	13,89%	5,56%	6,93%	0,00%
Polímeros	55,47%	21,17%	14,60%	0	0	0	8,76%
Farmacêutica	49,28%	0	11,59%	33,33%	0	0	5,80%
Tintas	38,00%	30,50%	14,50%	1,00%	4,00%	4,00%	8,00%
Papel	30,30%	30,10%	16,66%	0	4,74%	1,54%	16,66%
Óleo corte	1,49%	68,66%	1,49%	10,45%	1,49%	4,48%	11,94%

Tabela A 4.2: Resultados obtidos através do questionário quanto ao nível de conhecimento dos pontos críticos da área fabril nos 7 segmentos industriais avaliados. (Referente aos dados da Figura 9, página 70).

	Ótimo	Moderado	Fraco	Nenhum
Domissanitários	0	0	66,66%	33,33%
Cosméticos	75,00%	25,00%	0	0
Polímeros	0	0	60,00%	40,00%
Farmacêutica	100,00%	0	0	0
Tintas	17,50%	50,00%	17,50%	15,00%
Papel	71,42%	28,57%	0	0
Usinagem	0	0	60,00%	40,00%

Tabela A4.3: Resultados obtidos através do questionário quanto à existência de cronograma e de procedimento de limpeza e sanitização industrial (Referente aos dados da Figura 10, página 72).

	Sim	Não
Domissanitários	33,33%	66,66%
Cosméticos	83,33%	16,66%
Polímeros	20,00%	80,00%
Farmacêutica	100,00%	0
Tintas	17,50%	82,50%
Papel	100,00%	0
Usinagem	0	100,00%

Tabela A 4.4: Resultados da curva de crescimento dos biofilmes nas cinco superfícies testadas (referentes aos dados da Figura 16, página 88). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Tempo de amostragem (horas)	População Total (Log N)									
	Vidro		Aço carbono		Aço inoxidável		PVC		Alumínio	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
0,17	1,49	0,334	0,32	0,177	1,92	0,013	1,92	0,080	2,27	0,343
0,25	2,26	0,216	2,31	0,249	2,64	0,134	1,54	0,233	1,23	0,069
0,5	2,50	0,181	1,98	0,154	1,91	0,138	1,25	0,072	1,80	0,069
2	2,02	0,093	2,34	0,260	2,44	0,160	1,92	0,041	2,26	0,051
4	2,08	0,061	2,49	0,241	2,61	0,134	2,27	0,063	2,06	0,074
6	2,93	0,114	2,69	0,183	2,55	0,095	3,43	0,197	1,88	0,132
24	5,72	0,641	5,24	0,380	5,89	0,441	5,77	0,041	5,01	0,012
48	6,18	0,167	6,63	0,119	6,65	0,244	6,06	0,090	6,19	0,157
72	4,70	0,381	4,05	0,038	3,47	0,202	3,17	0,210	2,37	0,486
120	3,43	0,331	2,71	0,103	3,33	0,279	3,14	0,018	3,38	0,190

Tabela A 4.5: Resultados da curva de crescimento do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície dos cinco materiais (Referente aos dados da Figura 17, página 90). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Tempo de amostragem (horas)	População Total (Log N)									
	Vidro		Aço carbono		Aço inoxidável		PVC		Alumínio	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
0,17	1,96	0,260	2,31	0,036	2,10	0,144	2,14	0,071	2,11	0,005
1	3,25	0,031	3,33	0,238	3,26	0,147	3,05	0,337	2,91	0,626
1,5	3,30	0,162	3,85	0,177	4,17	0,220	4,67	0,180	4,36	0,054
2	3,78	0,188	3,23	0,129	3,03	0,101	3,02	0,304	3,75	0,118
4	3,35	0,213	3,25	0,249	3,18	0,100	3,25	0,357	3,73	0,113
6	4,47	0,103	4,13	0,134	4,37	0,170	4,70	0,213	4,44	0,117
24	5,46	0,205	3,90	0,598	5,71	0,129	4,57	0,065	5,66	0,213
48	6,70	0,107	6,10	0,144	6,49	0,185	6,44	0,088	6,57	0,065
72	4,84	0,274	3,38	0,177	4,05	0,071	4,39	0,135	4,50	0,172

Tabela A 4.6: Resultados da curva de crescimento dos biofilmes resultantes do óleo de corte contaminado com acréscimo de meio de cultura fresco após 48 horas de incubação (Referente aos dados da Figura 18, página 92). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Tempo de amostragem (horas)	População Total (LogN)									
	Vidro		Aço carbono		Aço inoxidável		PVC		Alumínio	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
0,17	1,66	0,160	1,45	0,213	1,22	0,110	1,56	0,084	1,82	0,119
0,25	2,66	0,160	3,41	0,337	3,18	0,314	2,47	0,265	3,82	0,147
0,5	4,85	0,084	4,58	0,058	4,04	0,056	3,95	0,494	4,28	0,065
2	3,11	0,245	3,29	0,047	3,16	0,168	3,32	0,088	3,73	0,148
4	3,48	0,031	3,14	0,088	3,36	0,212	3,77	0,082	3,25	0,103
6	4,39	0,835	4,89	0,269	4,86	0,068	4,57	0,114	4,87	0,242
24	6,70	0,144	6,91	0,105	6,48	0,249	6,43	0,181	6,83	0,045
48	7,47	0,125	7,14	0,066	7,37	0,198	7,77	0,135	7,25	0,069
72	8,31	0,134	8,52	0,147	8,71	0,059	8,59	0,185	8,85	0,088

Tabela A 4.7: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de vidro, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100 (Referente aos dados da Figura 26, página 105). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Concentração	População Total (LogN)									
	FBP-128		BNP-115		FBP-183		BP-509		BP-180	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
Uso	7,15	0,078	7,32	0,059	7,13	0,069	7,40	0,206	7,18	0,256
50 vezes	5,99	0,013	5,57	0,125	0,29	0,157	5,61	0,027	2,81	0,081
100 vezes	0,95	0,055	0,30	0,620	0,24	0,337	4,48	0,041	0,27	0,224

Tabela A 4.8: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de aço carbono, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100 (Referente aos dados da Figura 27, página 106). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Concentração	População Total (Log N)									
	FBP-128		BNP-115		FBP-183		BP-509		BP-180	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
Uso	6,93	0,084	6,84	0,036	6,17	0,041	5,53	0,514	6,73	0,101
50 vezes	5,86	0,026	5,09	0,074	0,29	0,124	4,75	0,075	2,31	0,160
100 vezes	0,47	0,103	0,69	0,049	0	0	4,68	0,176	0,12	0,597

Tabela A 4.9: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de aço inoxidável, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100 (Referente aos dados da Figura 28, página 106). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Concentração	População Total (Log N)									
	FBP-128		BNP-115		FBP-183		BP-509		BP-180	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
Uso	7,37	0,061	7,22	0,444	7,02	0,029	7,63	0,213	7,22	0,056
50 vezes	6,28	0,036	6,17	0,210	0,30	0,031	5,75	0,076	2,81	0,072
100 vezes	0,44	0,260	0,69	0,099	0	0	5,40	0,239	0,39	0,150

Tabela A 4.10: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de PVC, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100 (Referente aos dados da Figura 29, página 107). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Concentração	População Total (Log N)									
	FBP-128		BNP-115		FBP-183		BP-509		BP-180	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
Uso	6,35	0,182	6,32	0,059	5,92	0,444	6,44	0,272	6,17	0,307
50 vezes	5,41	0,213	5,37	0,197	0,30	0,062	5,75	0,114	2,81	0,057
100 vezes	0,41	0,103	0,68	0,163	0	0	4,99	0,410	0,36	0,260

Tabela A 4.11: Resultados da susceptibilidade aos biocidas dos biofilmes formados na superfície das partículas de alumínio, sendo: concentração de uso a concentração indicada pelo fabricante de microbicidas; 50 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 50 e 100 vezes a concentração indicada pelo fabricante multiplicada por 100 (Referente aos dados da Figura 30, página 107). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Concentração	População Total (Log N)									
	FBP-128		BNP-115		FBP-183		BP-509		BP-180	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
Uso	6,26	0,458	6,22	0,444	6,30	0,391	6,19	0,263	6,16	0,330
50 vezes	5,39	0,205	5,40	0,363	0,02	0,772	5,41	0,337	3,34	0,419
100 Vezes	0,44	0,260	0,64	0,321	0	0	5,06	0,459	0	0

Tabela A 4.12: Resultados da susceptibilidade, em termos da variação da concentração celular por massa de material, dos biofilmes formados na superfície dos materiais aos microbicidas em concentrações 10 vezes maiores que as indicadas pelo fabricante (Referente aos dados da Figura 31, página 111). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Concentração	População Total por Massa de Suporte (Log N/g)									
	FBP-128		BNP-115		FBP-183		BP-509		BP-180	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
Vidro	4,31	0,575	4,72	0,224	3,94	0,337	4,41	0,337	4,08	0,666
Aço Carbono	8,12	0,432	8,24	0,471	7,91	0,750	8,28	0,622	8,30	0,494
Aço Inoxidável	4,84	0,111	4,62	0,062	4,12	0,598	4,52	0,440	4,46	0,396
PVC	6,20	0,324	5,91	1,222	5,45	0,608	6,17	0,682	5,90	0,058
Alumínio	6,86	0,035	6,77	0,105	6,43	0,300	5,96	0,873	6,70	0,027

Tabela A 4.13: Resultados da susceptibilidade, em termos da variação da concentração celular por área, dos biofilmes formados na superfície dos materiais aos microbicidas em concentrações 10 vezes maiores que as indicadas pelo fabricante (Referentes aos dados da Figura 31, página 111). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Concentração	População Total por Área de Suporte (Log N/cm ²)									
	FBP-128		BNP-115		FBP-183		BP-509		BP-180	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
Vidro	2,09	0,125	2,34	0,230	1,59	0,207	1,77	1,092	1,90	0,183
Aço Carbono	6,17	0,568	6,38	0,428	6,25	0,268	6,53	0,333	6,35	0,568
Aço Inoxidável	2,98	0,022	2,70	0,344	2,35	0,410	2,76	0,083	2,40	0,772
PVC	3,70	0,244	3,95	0,082	3,31	0,492	3,87	0,093	3,32	0,329
Alumínio	4,74	0,084	4,37	0,413	4,07	0,482	3,98	0,046	4,19	0,625

Tabela A 4.14: Resultados da recuperação microbiana dos biofilmes formados na superfície das lâminas (com dimensões de 2,75 cm x 7,5 cm) de vidro, aço carbono e aço inoxidável (Referente aos dados da Figura 32, página 113). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Tempo de amostragem (dias)	População Total (Log N/cm ²)					
	Vidro		Aço carbono		Aço inoxidável	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
1	3,39	0,101	3,62	0,119	3,47	0,107
2	5,62	0,153	5,53	0,137	5,56	0,136
3	6,34	0,294	6,49	0,238	5,40	0,318
4	5,49	0,231	5,73	0,113	4,35	0,281
5	5,91	0,043	6,88	0,058	5,91	0,043
6	6,24	0,092	7,99	0,002	7,29	0,157
7	8,41	0,221	8,42	0,304	7,54	0,096
8	8,17	0,092	8,28	0,101	6,69	0,088
9	8,99	0,055	8,36	0,184	7,33	0,349
10	8,42	0,355	8,42	0,427	7,46	0,004
11	9,14	0,197	9,35	0,207	8,51	0,359
12	9,39	0,211	9,51	0,169	8,28	0,084
13	9,60	0,049	9,57	0,080	8,47	0,035
14	9,36	0,443	9,50	0,107	8,49	0,018
15	10,42	0,248	10,42	0,304	9,45	0,061

Tabela A 4.15: Resultados da recuperação microbiana dos biofilmes formados na superfície das lâminas (com dimensões de 2,75 cm x 7,5 cm) de PVC e alumínio, e das células em suspensão (Referente aos dados da Figura 32, página 113). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Tempo amostragem (dias)	População Total (Log N/cm ²)					
	PVC		Alumínio		Emulsão	
	Contagem	DP	Contagem	DP	Contagem	DP
1	2,48	0,119	2,56	0,131	6,78	0,103
2	4,54	0,125	4,49	0,194	6,88	0,023
3	5,76	0,061	5,10	0,797	7,64	0,151
4	3,91	0,048	4,58	0,299	6,91	0,081
5	4,99	0,005	4,91	0,081	7,76	0,059
6	7,38	0,219	7,38	0,088	7,90	0,029
7	7,69	0,136	7,77	0,085	8,94	0,029
8	7,35	0,251	7,26	0,324	8,78	0,114
9	7,15	0,179	7,43	0,328	9,91	0,095
10	7,51	0,181	7,38	0,114	9,78	0,214
11	8,60	0,203	8,51	0,209	8,62	0,151
12	8,47	0,275	8,36	0,184	7,70	0,174
13	8,52	0,387	8,60	0,060	6,70	0,088
14	8,47	0,341	8,45	0,254	7,80	0,067
15	9,37	0,157	9,04	0,056	8,94	0,028

Tabela A 4.16: Resultados da recuperação da população microbiana dos biofilmes e da emulsão e do residual de triazina no sistema com 0,1% de microbicida (referentes aos dados da Figura 33, página 115). N refere-se à população celular, C à contagem e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Tempo de amostragem (dias)	Residual de triazina na emulsão (ppm)	População Total por Tipo de Material (Log N/cm ² ou Log N/mL)											
		Vidro		Aço carbono		Aço inoxidável		PVC		Alumínio		Emulsão	
		C	DP	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP
1	650	3,87	0,064	3,73	0,060	3,83	0,050	3,85	0,101	3,70	0,116	6,58	0,386
2	700	4,18	0,167	4,41	0,166	4,47	0,255	4,19	0,086	4,45	0,205	6,25	0,298
4	650	5,04	0,983	5,62	0,106	5,55	0,063	5,62	0,136	5,63	0,229	6,71	0,125
6	450	7,67	0,106	7,44	0,299	7,53	0,330	7,64	0,199	6,84	0,034	7,40	0,461
8	700	7,52	0,226	7,55	0,202	7,52	0,188	7,63	0,118	7,68	0,024	6,55	0,097
10	550	7,71	0,100	7,72	0,119	8,12	0,09	7,70	0,059	8,32	0,128	6,91	0,057
12	450	8,47	0,275	7,68	0,066	8,41	0,191	8,57	0,080	8,53	0,102	7,96	0,046
14	500	8,38	0,140	8,10	0,025	8,39	0,206	8,41	0,191	8,40	0,216	6,94	0,020
16	650	8,55	0,180	8,55	0,009	8,67	0,023	8,60	0,187	8,62	0,112	6,76	0,070

Tabela A 4.17: Resultados da recuperação da população microbiana dos biofilmes e da emulsão e do residual de triazina no sistema com 0,2% de microbicida (Referente aos dados da Figura 34, página 116). N refere-se à população celular e DP ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Tempo de amostragem (dias)	Residual de triazina na emulsão (ppm)	População Total por Tipo de Material (Log N/cm ² ou Log N/mL)											
		Vidro		Aço carbono		Aço inoxidável		PVC		Alumínio		Emulsão	
		C	DP	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP
1	1100	1,71	0,107	1,78	0,213	1,69	0,013	1,53	0,245	1,91	0,030	4,54	0,088
2	1000	1,26	0,201	1,49	0,337	1,71	0,048	1,58	0,081	1,63	0,172	4,59	0,157
4	1200	1,61	0,060	1,65	0,208	1,49	0,213	1,65	0,027	1,81	0,050	4,50	0,058
6	1000	1,67	0,167	1,70	0,144	1,69	0,076	1,85	0,086	1,77	0,052	3,70	0,097
8	1000	1,85	0,095	1,78	0,191	1,85	0,077	1,76	0,149	1,83	0,197	3,58	0,128
10	1200	1,70	0,147	1,89	0,095	1,70	0,182	1,92	0,052	1,66	0,237	2,68	0,163
12	1250	1,97	0,007	1,70	0,049	1,79	0,110	1,85	0,077	1,59	0,016	2,74	0,090
14	1000	1,82	0,183	1,63	0,527	1,92	0,067	1,48	0,199	1,66	0,199	2,60	0,031
16	1100	1,60	0,153	1,73	0,193	1,70	0,025	1,83	0,213	1,71	0,107	2,47	0,103

Tabela A 4.18: Resultados da recuperação microbiana na emulsão óleo/água e dos biofilmes formados na superfície das lâminas de aço carbono após o uso da estratégia de choque por 3 dias consecutivos (Referentes aos dados da Figura 35, página 118). DP refere-se ao desvio padrão da medida realizada em triplicata.

Tempo de amostragem (h)	População na emulsão óleo/água (UFC/mL)		População total de células nas lâminas de aço carbono (UFC/cm ²)	
	Contagem	DP	Contagem	DP
1	6,87	0,049	6,33	0,223
2	4,47	0,062	6,17	0,074
3	3,37	0,131	6,33	0,229
4	3,46	0,288	6,65	0,117
5	3,73	0,136	6,47	0,265
12	4,75	0,082	6,74	0,128
24	6,44	0,514	5,90	0,032
25	5,30	0,031	5,47	0,116
26	4,61	0,091	5,57	0,242
27	4,86	0,026	5,81	0,088
28	3,46	0,251	5,00	0,062
29	3,04	0,039	5,68	0,197
36	4,89	0,079	4,41	0,337
48	4,91	0,083	3,08	0,051
49	2,87	0,103	3,63	0,198
50	2,11	0,047	3,46	0,288
51	2,78	0,049	3,60	0,181
52	2,65	0,110	3,27	0,131
53	2,48	0,220	3,67	0,106
60	3,64	0,127	0	0
72	3,86	0,102	0	0